

Jonas Excell

Diffuusio-erotteisen spektroskopiamenetelmän kehitys käyttäen dekstraania sekä hiivaekstraktia

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

3.12.2013

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Jonas Excell Diffuusio-erotteisen spektroskopiamenetelmän kehitys käyttäen dekstraania sekä hiivaekstraktia 49 sivua 3.11.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Yliopettaja Jukka Niiranen Dosentti Hannu Maaheimo
<p>Tämän työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä käyttäen hyväksi DOSY (<i>Diffusion ordered spectroscopy</i>, diffuusio-erotteinen spektroskopia) -tekniikkaa. Luotua menetelmää on tarkoitus soveltaa muihin myöhemmin tapahtuviin tutkimuksiin. Aluksi opeteltiin DOSY-tekniikkaa mittaamalla erikokoisia dekstraanistandardeja. Tämän jälkeen menetelmää sovellettiin monipuoliseen hiivaekstraktinäytteeseen.</p> <p>Työ suoritettiin käyttämällä VTT:n Bruker Avance III 600 MHz NMR-spektroskopia laitteistoa.</p> <p>Mitattujen dekstraanistandardien diffuusiovakioita verrattiin tuloksiin, jotka oli saatu Varian Unity INOVA 600 MHz NMR -spektroskopia laitteistolla.</p> <p>Diffuusiovakioiden ollessa sopusoinnussa Varian laitteella saatujen vakioiden kanssa, sovellettiin luotua tekniikkaa hiivanäytteeseen, joka oli peräisin <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -kannasta.</p> <p>Työn tavoitteet saavutettiin. Onnistuttiin luomaan menetelmä, jolla saatiin samoja tuloksia dekstraanistandardeille, sekä erottamaan hiivanäytteen yhdisteitä toisistaan. Hiivan kohdalla ei saatu kuitenkaan yhdisteitä tunnistettua.</p>	
Avainsanat	DOSY, NMR, dekstraani

Author Title	Jonas Excell The Development of a Diffusion Ordered NMR-Spectroscopy Method, Using Dextran and Yeast-extract
Number of Pages Date	49 pages 3 November 2013
Degree	Bachelor Degree in Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Principal Lecturer Hannu Maaheimo, Docent
<p>The aim of this thesis was to develop a method using the DOSY technique. This method would then later be applied to new research topics. We started with getting familiar with the DOSY technique by measuring different sized dextran standards. The method in hand was then applied to a complex yeast-extract sample.</p> <p>The conducted work was carried out using VTTs Bruker Avance III 600 MHz NMR spectrometer.</p> <p>The resulting diffusion coefficients of the dextran standards were compared to the results from a different NMR machine, a Varian Unity INOVA 600 MHz model NMR machine.</p> <p>Once the diffusion coefficients were in agreement with the Varian results, the method was applied to a yeast sample, extracted from the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> species.</p> <p>The set goals were achieved. We managed to create a method which yielded results that were in agreement with the results from the Varian machine. In addition we managed to separate the different components of the yeast sample from each other. Regrettably the components were not yet identified.</p>	
Keywords	DOSY, NMR, Dextran

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	2
2.1	Ydinmagneettinen resonanssi	2
2.1.1	NMR:n perusteet	2
2.1.2	Magneettikentän vaikutus	3
2.1.3	Resonanssin tuottaminen	4
2.1.4	Viritystilän purkautuminen	7
2.2	Diffuusio-erotteinen spektroskopia	7
3	NMR-laite	11
4	Työn vaiheet	13
4.1	Dekstraanistandardien valmistus	14
4.2	1d-mittaukset dekstraanille	15
4.3	Pulssisekvenssin valinta	19
4.4	Dekstraanistandardien mittausero-optimointi	22
4.5	Dekstraanistandardien mittausero- ja prosessointi	27
4.6	Hiivan mittausero-optimointi	30
4.7	Hiivan mittausero- ja prosessointi	34
5	Ongelmatilanteet	37
5.1	Lukon vaihevirhe	37
5.2	Rajoittava teho	38
5.3	Standardit 150 sekä 668	39
5.4	Hiivaekstraktin pulssisekvenssi	39
6	Tulokset	41
7	Johtopäätökset	44
8	Pohdintaa	46
	Lähteet	47

1 Johdanto

Ydinmagneettisella resonanssi-spektroskopiolla (NMR) on lukuisia eri sovelluksia. Uusia menetelmiä sekä niiden soveltavuusalueita tutkitaan jatkuvasti.

VTT:llä hyödynnetään NMR-tekniikkaa mm. solujen metabolian tutkimisessa. NMR:ää on hyödynnetty molekyylien rakennemäärittysten lisäksi yhdisteiden pitoisuuksien kvantitoimiseen. Metabolomiikan tutkimusalueen kasvaessa sekä näytteiden kompleksisuudesta johtuen on DOSY tervetullut tekniikka kyseiselle tutkimusalalle. Sen myötä helpottuu monimutkaisten näytteiden tulkitseminen, kuten esimerkiksi solu-ekstraktinäytteiden, jotka sisältävät huomattavan määrän eri metabolisia tuotteita.

Vaikka NMR-tekniikalla voidaan mitata eri ytimiä kuten ^{13}C sekä ^{15}N , keskityttiin tässä työssä vain yleisen ^1H -mittaukseen. Työssä keskityttiin luomaan alustava menetelmä, jota VTT voi soveltaa muissa tutkimuksissaan. Luodussa menetelmässä hyödynnettiin DOSYn ominaisuuksia, joita käytettiin dekstraanistandardien diffuusiovakioiden selvittämiseen, sekä erottamaan monipuolisen hiiva-ekstraktinäytteen yhdisteet toisistaan.

Dekstraani valittiin tutkittavaksi analyytiksi sen saatavuuden takia, sekä sen vakioiden ollessa tunnettuja aikaisemmasta tutkimuksesta. Aiemmat mittaukset suoritettiin Varian 600 MHz -laitteella, joten työssä käytetyn Bruker 600 MHz -laitteen tuloksilla voidaan verrata vakioita toisiinsa. Samalla nähtäisiin luodun menetelmän toimivuus.

Menetelmässä keskityttiin luomaan näytteille samankaltaiset ympäristöt näytteille kuin oli käytetty Varianin mittauksissa. Liuottimena käytetty raskas vesi (D_2O), mittaustemperötila, sekä standardien pitoisuudet pidettiin samoina.

Hiivaekstraktinäyte oli peräisin *Saccharomyces cerevisiae* -kannasta. Näyte oli säästetty VTT:n aiemmista töistä.

2 Työn teoria

2.1 Ydinmagneettinen resonanssi

NMR (*nuclear magnetic resonance*) eli ydinmagneettinen resonanssi on ilmiö, joka tapahtuu, kun tiettyjen atomien ytimet ovat homogeenisen magneettikentän sekä toisen muuttuvan magneettikentän vaikutuksen alaisena. Kaikki ytimet eivät koe kyseistä ilmiötä, vaan ilmiö vaatii tietynlaisen ydinominaisuuden, nimeltä spin. Ydinmagneettinen resonanssi -spektroskopia on tämän ilmiön tutkimista.

2.1.1 NMR:n perusteet

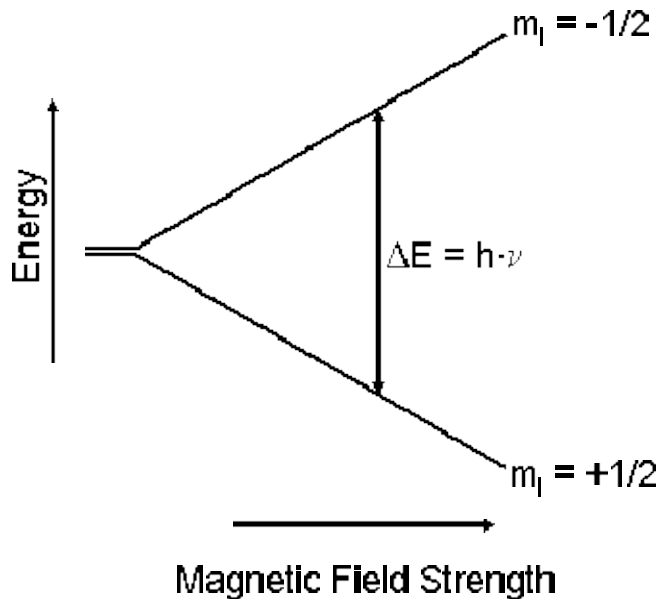
Kuten edellä mainittiin, jotta ytimessä tapahtuisi resonanssia, vaatii ydin spinominaisuuden. Spin on perusluontoinen ominaisuus, kuten massa tai varaus. Sillä kuvataan hiukkasen pyörimissuuntaa, joka ilmoitetaan $\frac{1}{2}$ -arvolla, tämä voi olla joko positiivinen tai negatiivinen. Jos ytimellä on parillinen määrä protoneita ja neutroneita (esimerkiksi ^{12}C , jossa on 6 neutronia sekä 6 protonia) on sen spinkvanttiluku 0. Vastaavasti jos ytimellä on pariton määrä protoneita tai neutroneita, on sen spinkvanttiluku erisuuri kuin 0 (esimerkiksi ^{14}N jossa on 7 neutronia sekä 7 protonia). Vain ytimiä, joiden spinkvanttiluku on erisuuri kuin 0, voidaan havaita, sillä spinin ansiosta saa ydin magneettisen momentin, jota kuvataan vektorilla. Tällöin voidaan kuvitella ydinten käyttäytyvän kuten magneetit, ne omaavat positiivisen sekä negatiivisen navan. [1.] Taulukossa 1 on esitetty yleisimpiä tutkittavia ytimiä. [2.]

Taulukko 1. Yleisimpien tutkittavien ytimien parittomien protonien sekä neutronien lukumäärä, sekä niiden antama spinkvanttiluku. Kaksi eniten tutkittua ydintä ovat ^1H sekä ^{13}C .

Ydin	Esiintyvyys	Parittomia protoneita	Parittomia neutroneita	Spinkvanttiluku
^1H	99,98 %	1	0	$\frac{1}{2}$
^2H	0,02 %	1	1	1
^{31}P	100 %	1	0	$\frac{1}{2}$
^{23}Na	100 %	1	2	$\frac{3}{2}$
^{14}N	99,6 %	1	1	1
^{13}C	1,1 %	0	1	$\frac{1}{2}$
^{19}F	100 %	1	0	$\frac{1}{2}$
^{15}N	0,4 %	1	0	$\frac{1}{2}$

2.1.2 Magneettikentän vaikutus

Luonnossa ydinten magneettikentät suuntautuvat sattumanvaraisesti. Kun ytimet tuodaan voimakkaaseen magneettikenttään, asettuvat ytimien spinin kahteen eri energiatilaan, magneettikentän mukaisesti $-1/2$ tai magneettikentän vastaisesti $+1/2$. Energiaero on suoraan verrannollinen ulkoisen magneettikentän voimakkuuteen B_0 . Kuvassa 1 on esitetty energiatilojen jakautuminen. [2.]



Kuva 1. $1/2$ - spin omaavien ydinten jakautuminen energiatiloihin. Magneettikentän voimistuessa (*magnetic field strenght*), kasvaa kyseinen energiaero. [3.]

Energiatilat ovat jakautuneet Boltzmannin jakauman mukaisesti, eli termodynaamisesti matalammalla energiatasolla on suurempi määrä hiukkasia kuin korkeammalla energiatasolla. NMR signaali perustuu ydinten siirtymisestä energiatilojen väillä, ja signaalin voimakkuus on suhteessa näiden energiatilojen välisten ytimien populaatio eroon.

Jotta siirtyminen matalammalta energiatasolta korkeammalle voi tapahtua, vaaditaan siihen energiaa. Tämä energia saadaan sähkömagneettisesta säteilystä, jonka taajuus vastaa energiatasojen eroa. Tätä taajuutta kutsutaan Larmor-taajuudeksi, joka on sama kuin hiukkasen pyörimistaajuus. Pyörimistaajuus on hiukkasen aiheuttama magneettinen momentti sen pyöriessä z-akselin ympäri. [4.] Taajuuden energia saadaan laskettua käyttämällä kaavaa 1.

$$E = h\nu \quad (1)$$

h = Planckin vakio = $6,63 \cdot 10^{-34}$ Js

ν = taajuus [Hz]

E = fotonin energia

Kuvan 1 esittämä energiatilojen ero ΔE lasketaan kaavalla 2.

$$\Delta E = \gamma \hbar B \quad (2)$$

γ = gyromagneettinen suhde

\hbar = redusoitu Planckin vakio, $\frac{h}{2\pi} = 1,05 \cdot 10^{-34}$ Js

B = magneettikentän voimakkuus

Gyromagneettinen suhde on vakio tietyille magneettisen ominaisuuden omaaville ytimille, esimerkiksi protonin gyromagneettinen suhde on $2,675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ [5], tai 42,58 MHz/T. Tämän suhteen avulla ilmoitetaan myös NMR-laitteen voimakkuus, esimerkiksi työssä käytetyn laitteen voimakkuus on 600 MHz, joka saadaan laskemalla protonin gyromagneettinen suhde * magneetin voimakkuus (14,1 T).

Täten, yhdistämällä kaavat 1 ja 2, saadaan aikaiseksi yhtälö 3, jolla kuvataan vaadittavaa taajuutta resonanssin muodostamiseksi. Tämän yhtälön täytyessä, tapahtuu aiemmin mainittu resonanssi, jota havaitaan NMR-laitteella. [6.]

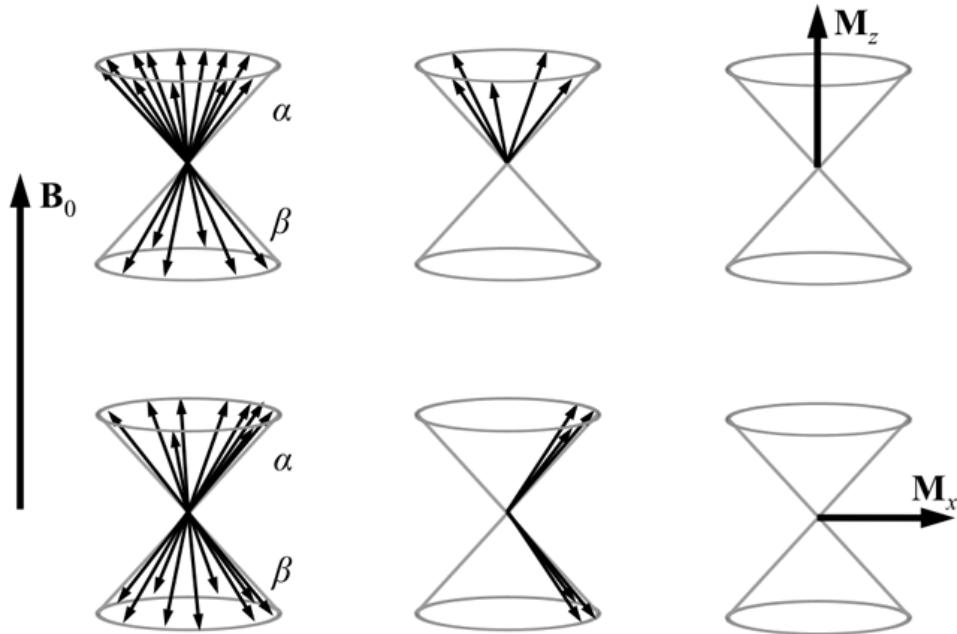
$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (3)$$

2.1.3 Resonanssin tuottaminen

Kuten yhtälön 3 myötä esitettiin, on viritystaajuus riippuvainen ytimen gyromagneettisesta suhteesta magneettikentän pysyessä vakiona. Tätten yhden ytimen virittämistä varten vaadittaisiin vain yksi taajuus jota lähetettäisiin näytteeseen. Kuitenkin todellisuudessa näyte koostuu useasta eri ytimeistä. Jotta kaikki ytimet voitaisiin virittää samanaikaisesti, joudutaan turvautumaan pulssimenetelmään.

Pulssimenetelmällä lähetetään kaikkia taajuuksia samaan aikaan, jolloin pulssi virittää tutkittavan näytteen kaikki spinit, ja saadaan aikaan niiden resonanssi. [7, s.12.]

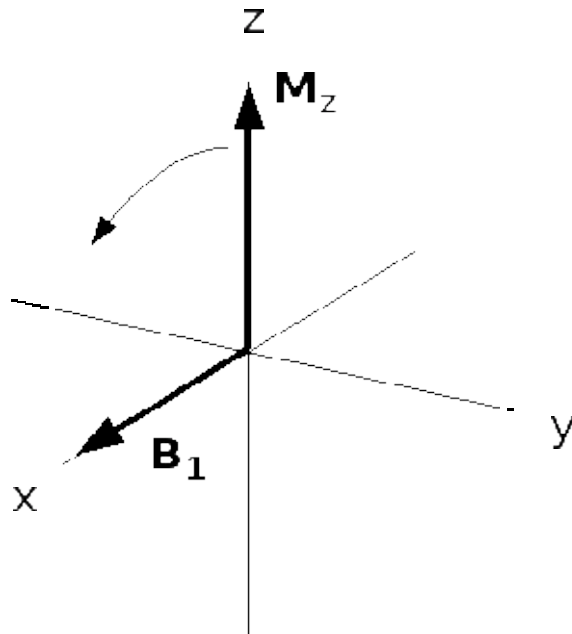
Pulssin vaikutusta voidaan havainnollistaa vektorimallin avulla (kuva 2).



Kuva 2. Vektorimalli, jossa M :lla kuvataan magnetisaation vektorisummaa [8.].

Kuvasta nähdään, kuinka vektorimallia kuvataan. Ylemmän rivin vasemmalta puolelta alkaen nähdään, kuinka α :n suuntaisesti on suurempi määrä magnetisoituneita ytimiä. Siirryttäessä oikealla puolella olevaan kuvaan nähdään, kuinka jäljellä on vain α :n ja β :n erotuksen summa, ja niiden luoma makroskooppinen magnetisaatiovektori M_z nähdään viimeisestä kuvasta, joka on suuntautuneena z-akselin mukaisesti. Tämä on lepotila, kun magneettikenttä B_0 on kuvan osoittamassa suunnassa. Alemmassa osiossa nähdään, kuinka α - ja β -ydinten magnetisaatio on keskittynyt x-akselin mukaisesti, luoden sen suuntaisesti magnetisaatiovektorin. [8.]

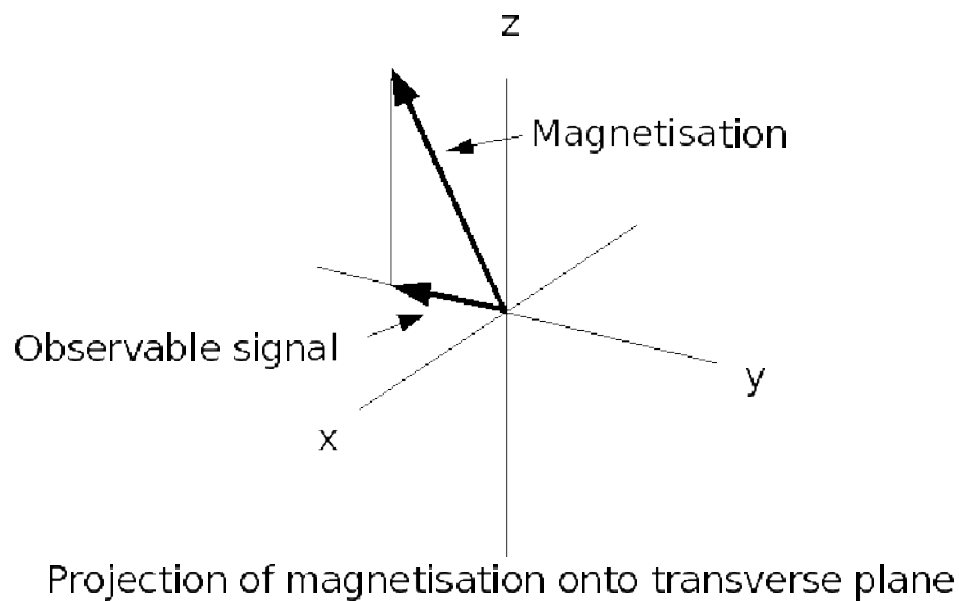
Pulssimenetelmässä käytettyjä pulsseja kuvataan tyypillisesti 90° :n sekä 180° :n pulsseiksi. Kuvassa 3 on 90° :n pulssin vaikutus magnetisaatioon.



Kuva 3. 90°:n pulssin vaikutus magnetisaatioon, magnetisaatio siirtyy tasapainotilasta M_z y-akselille [9].

90°:n pulssin B_1 myötä, siirretään magnetisaation vektorisumma kokonaisuudessaan z-akselilta y-akselille.

Täydellisellä 90°:n pulssilla saadaan suurempi signaali verrattuna epätäydelliseen pulssiin, kuten kuvassa 4 on esitetty.

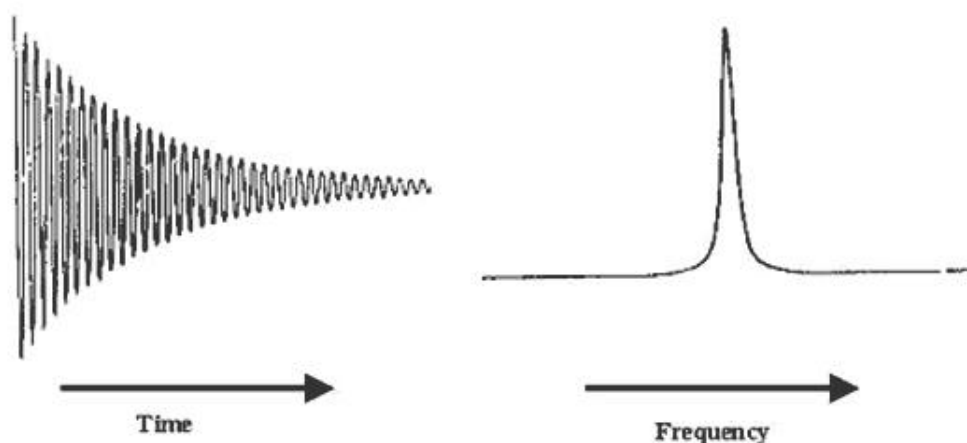


Kuva 4. Epätäydellinen magnetisaation siirtyminen, ja sen vaikutus signaalin voimakkuuteen [9.]

Kuvasta nähdään, kuinka havainnoitava signaali on pienempi verrattuna kuvan 3 signaaliin, tämän myötä on syytä kalibroida 90° :n pulssi jokaiselle näytteelle, jota mitataan. [9] Tämä kalibrointi on automatisoitu Brukerin NMR-laitteissa kun mitataan protoneja.

2.1.4 Viritystilan purkautuminen

Kun magnetisaatio on siirretty xy-tasoon ja virityspulssi on katkaistu, alkaa detektoitu signaali oskiloimaan. Oskiloimisen detektio tapahtuu siten, että magnetisaatio pyörii xy-tasossa Larmor-taajuudella jonka tuloksena saadaan vaimeneva käyrä nimeltä FID eli *free induction decay*. FID:n käyrässä ovat yhteenlaskettuna kaikki näytteestä tulevat signaalit. Fourier-muunnoksella saadaan FID:stä spektri. Kuvassa 5 on esitetty ensiksi FID, sekä siitä saatu spektri käyttäen Fourier-muunnosta. [7, s. 12.]



Kuva 5. Vasemmalla on magnetisaation oskiloimisesta saatu FID, ja oikealla on siitä tehty Fourier-muunnoksella spektri [10].

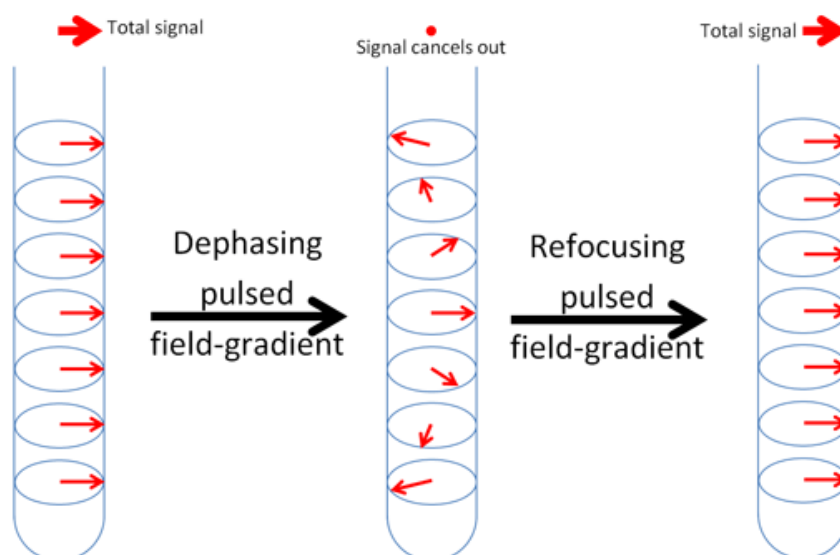
2.2 Diffuusio-erotteinen spektroskopia

NMR:ssä diffuusio-erotteisella spektroskopiolla (*DOSY, diffusion ordered spectroscopy*) tarkoitetaan NMR-signaalien erottamista toisistaan niiden erilaisten diffuusiovakioiden avulla. DOSY-spektri saadaan aikaiseksi käyttäen hyväksi pulssisekvenssiä, jossa hyödynnetään erisuuruisia gradienttivoimakkuuksia. Näiden gradienttien avulla saadaan aikaiseksi vaimeneva signaali, jonka avulla voidaan laskea diffuusiovakiot yhdisteille. DOSY spektri on 2D spektri, jossa toinen akseli on diffuusiovakio, ja toinen akseli kemiallinen siirtymä. [11.]

DOSYn hyötynä on esimerkiksi monimutkaisten metaboliaseoksien yhdisteiden erottaminen toisistaan, sekä kyseisten yhdisteiden tunnistaminen. [12, s. 1.]

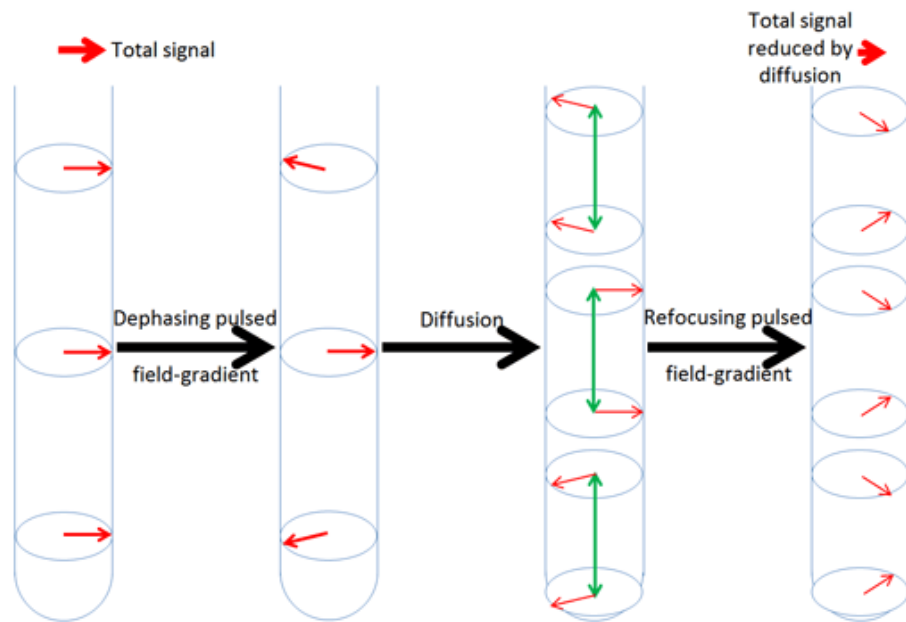
Tässä työssä DOSYä on käytetty erikokoisten dekstraanistandardien diffuusiovakioiden selvittämiseen, sekä monimutkaisten hiivaekstraktin yhdisteiden erottamiseen toisistaan.

Yksinkertaisuudessa diffuusiokoe on seuraavanlainen. Näytteen magnetisaatio viritetään 90° :n pulssin avulla, minkä jälkeen näennäisesti hävitetään signaali gradienttipulssin avulla. Ajan $\Delta/2$ jälkeen suoritetaan 180° :n pulssi, jolla invertoidaan signaali vastakkaisuuntaiseksi. Tätä seuraa jälleen $\Delta/2$:n pituinen tauko, jonka jälkeen ajetaan toinen gradienttipulssi signaalin palauttamiseksi. Jos molekyylit liikkuvat ensimmäisen $\Delta/2$ -viiveen aikana, liikkuvat ne seuraavan $\Delta/2$ -viiveen aikana saman verran. Kuvassa 6 esitetään signaalin hävittäminen sekä palauttaminen. [13.]



Kuva 6. NMR-signaalin hävittäminen sekä palauttaminen, käyttäen hyväksi gradienttipulssia [13.]

Signaalin palautus onnistuu ainoastaan niille ytimille, jotka eivät ole liikkuneet huomattavaa määrää näyteputkessa. Kuvassa 7 esitetään ei-halutun diffuusion vaikutus signaalin hävittämiseen, sekä sen palauttamiseen. Tästä syystä on oleellista eliminoida mahdolliset laminaarivirtaukset näyteputkessa.



Kuva 7. Ei-halutun diffuusion vaikutus. Gradienttipulssin jälkeen molekyylit siirtyvät eripaikkoihin näyteputkessa, jolloin palautuspulssin jälkeen ei päästä alkuperäiseen tilanteeseen. [13.]

Pulssisekvenssiä toistetaan useaan otteeseen. Tässä työssä sitä toistettiin 32 kertaa, ja jokaisen sekvenssitoiston jälkeen muutettiin gradientin voimakkuutta, jolloin saatiin aikaiseksi signaalin vaimentumista, sillä diffuusiota ehtii tapahtua yhä enemmän. Signaalin vaimentuminen lasketaan yhtälön 4 avulla. [14, s. 4.]

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} \quad (4)$$

I = havaittu intensiteetti

I_0 = referenssi intensiteetti (vaimentamaton signaalin intensiteetti)

D = diffuusiovakio

γ = gyromagneettinen suhde

g = gradientin voimakkuus

δ = gradientin pituus

Δ = diffuusioon käytetty aika

Diffuusiovakio on sekä laskettavissa että mitattavissa oleva arvo. Pallomaisen yhdisteen diffuusiovakion laskemiseen voidaan käyttää Stokes-Einsteinin yhtälöä (yhtälö 5). [14, s. 4]

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

(5)

D = diffuusiovakio

k = Boltzmannin vakio

T = lämpötila

η = liuoksen viskositeetti

r_s = molekyylin hydrodynaaminen säde

Yhtälön kautta nähdään, että diffuusiovakio on riippuvainen mittauslämpötilasta sekä mittauksessa käytetyn liuoksen viskositeetista. Näin ollen ei voida mieltä diffuusiova-
kiota fyysisenä luonnonvakiona, vaan vakiona joka on riippuvainen ympäristöstään. Kuitenkin ympäristön ollessa sama eri mittauksissa, on diffuusiovakiokin sama.

3 NMR-laite

Toisin kuin esimerkiksi GC-MS-laite, joka on kokonaisuutena yhtenä laitteena. Koostuu NMR-laitteisto magneettista sekä laitteistosta, joka lähettää radiotaajuuspulsseja ja vastaanottaa näytteen lähettämän signaalin. [15.]

Magneettikenttä luodaan käyttämällä supraohdemagneettia, joka on käytännössä käämi, jonka läpi on johdettu sähkövirta. Magneettia pidetään n. 4 K:n lämpötilassa, jolloin sähkövirta etenee magneetissa lähes häviöttömästi, tällöin magneetti on suprajohtava. Jotta magneetti säilyisi suprajohtavana, sitä on jatkuvasti pidettävä kylmässä. Tämä toteutetaan nestemäisellä heliumilla, joka ympäröi magneettia. Nestemäistä heliumia ympäröi tyhjiö, jonka toisella puolella on nestemäistä typpeä, jolla vähennetään heliumin höyrystymistä. Jotta voidaan vielä vähentää ympäristön lämmön vaikutusta kalliiseen heliumiin, on nestemäisen typen suojana tyhjiö. Magneetin lävitse kulkee pystysuuntaisesti (magneettikentän suuntaisesti) putki, jota pitkin viedään näyte mittapäälle. Tämän putken lämpötilaa voidaan muuttaa näytteen vaatimusten mukaisesti. [16.]

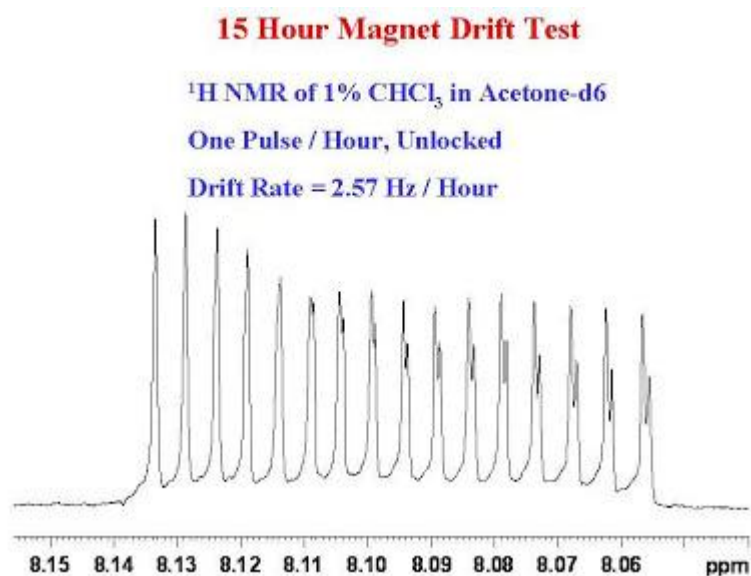
Radiotaajuuksia (RF) lähetetään ja vastaanotetaan probella (mittapää). Mittapää sisältää keloja, joilla lähetetään RF-pulssit sekä vastaanotetaan näytteen lähettämät vasteteet. Magneettikentän epähomogeenisyyttä korjataan erillisillä sähkömagneeteilla, joita kutsutaan shimmikeloiksi, nämä antennit ympäröivät mittapäättä. Moderneissa laitteissa voi olla jopa 40 eri shimmiä, ja jokaisen shimmin luomaa magneettikenttää voidaan muuttaa sähkövirran avulla. Tällöin saadaan kumottua magneettikentän epähomogeenisyyttä näytteen ympärillä. [16.]

Mittapää sijaitsee NMR-laitteen sydämessä, eli magneettikentän keskellä. Koska mittapää on erillinen osa, sen voi vaihtaa erilaiseen mittapäähän. Laitevalmistajilla on erilaisia mittapäitä, jotka eroavat ominaisuuksiltaan. Esimerkiksi kylmämittapäissä (cryoprobe) ovat kelat ja esivahvistimet jäähdytettyinä, jolloin lämpökohina pienenee ja herkkyys paranee jopa 400 % verrattaessa huoneenlämpöiseen mittapäähän. Käytettävä mittapää riippuu myös siitä mitä tutkitaan, on olemassa esimerkiksi mittapäitä, joilla voidaan seurata protoni- ^1H - ja hiili- ^{13}C -kanavia samanaikaisesti, tai vaikka typpi- ^{15}N - ja fosfori- ^{31}P -kanavia erikseen. [17]

NMR-konsoli on kompleksi joka sisältää vahvistimia, radiolähettämiä ja -vastaanottimia, taajuusgeneraattoreita, AD-muuntimia (analogia-digitaalimuunnin) sekä tietokoneen. Kokonaisuudessaan konsolin tehokas tietokone ohjaa koko NMR-laitteistoa. Konsolin tietokoneella on kriittinen rooli, sillä se joutuu mm. seuraamaan reaaliajassa näytteen lähettämää signaalia ja prosessoimaan sitä sekä muuttamaan ja seuraamaan mittauksen taajuutta, vaihetta, lukkoa ja lämpötilaa sekä signaalin suodatusta. [18.]

Konsolin vastaanottama informaatio siirtyy verkon kautta työasemalle, jolle tieto tallennetaan jatkokäsittelyä varten. Tämän työaseman ohjelmiston avulla myös syötetään konsolille tieto, mitä parametreja se joutuu syöttämään muulle laitteistolle, kuten esimerkiksi erittäin tärkeä taajuuslukko.

Taajuuslukolla kompensoidaan pieniä muutoksia magneettikentässä. Vaikka suprajohdatavat magneetit ovat stabiileja, niissä tapahtuu drifusta eli magneettikentän heikkenemistä. Vaikka heikkeneminen on hidasta, sen vaikutus pitkissä mittauksissa on merkittävä. Mittaukset voivat kestää jopa päiviä, joten magneettikentän pitäminen stabiilina on erityisen tärkeää mittauksen kannalta. Jos magneettikenttä ei ole stabiili, resonansitaajuus muuttuu, jolloin spektrin signaalit siirtyvät ja mittaus epäonnistuu. Kuvassa 8 on esimerkki driftauksesta. [19.]



Kuva 8. Driftauskoe, jossa mitattu protonispektri 1 % CHCl₃:sta asetoni-d₆:ssa. Kyseessä on mittaus, jota suoritettiin 15 h ajan ja jossa kerran tunnissa ajettiin mittauspulssi. Ajan muuttuessa resonansitaajuus siirtyy oikealle.[19.]

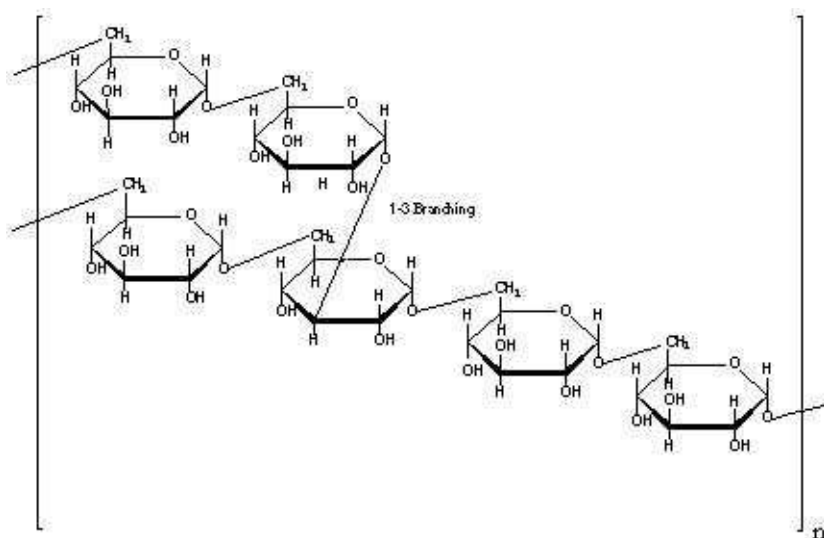
Driftausta kompensoidaan siten, että seurataan deuterium-liuottimen signaalia ja verrataan sitä vakiona pysyvään signaaliin. Liuottimen signaalin taajuuden muuttuessa kompensoi lukkomekanismi magneettikentän voimakkuutta, pitäen mittauksen magneettikentän taajuutta vakiona. [20.]

4 Työn vaiheet

Tämä opinnäytetyö suoritettiin VTT:n Bruker 600 MHz NMR-laitteella Helsingin yliopiston tiloissa Viikissä. Laite koostui Oxford Cryosystems:n valmistamasta 600 MHz:n magneetista sekä Brukerin nelikanavaisesta (protoni- ^1H , hiili- ^{13}C , fosfori- ^{31}P ja typpi- ^{15}N) cryoprobea, jossa on Z-suuntainen gradientti, jonka vahvuus on 0,53 T/m. Konsolina toimii Brukerin AVANCE III -konsoli, jota ohjattiin TOPSPIN 3,1 -ohjelmistolla.

Tehdyssä työssä oli kaksi vaihetta; dekstraanimolekyylien diffuusiovakioiden määrittäminen ja niiden vertaaminen toiseen datasarjaan, sekä hiivaekstraktinäytteen komponenttien erotus diffuusion avulla.

Dekstraani on polysakkaridi (kuva 9), joka on muodostunut glukoosimolekyyleistä. Ketju muodostuu α -1,6-linkeistä, sekä α -1,3-haarautumisista. Dekstraanien koot vaihtelevat 3 – 2000 kDa:n välillä



Kuva 9. Osa geneeristä dekstraaniketjua, jossa on α -1,3-haarautuminen [21.]

4.1 Dekstraanistandardien valmistus

Standardit saatiin valmiiksi punnittuina kiinteässä muodossa. Dekstraanistandardit esivalmistettiin taulukon 2 mukaisesti. Standardit 12 kDa:n sekä 670 kDa:n välillä ovat Flukan (Buchsm, Switzerland) valmistamat, suuremmat 3500 kDa:n sekä 11 900 kDa:n standardit ovat Polymer Standards Servicen (Mainz, Germany) valmistamia. [22, s. 200].

Taulukko 2. Dekstraanistandardien esivalmistus. Standardien molekyylipainot ovat valmistajan ilmoittamia. [22, s. 201.]

Standardi (kDa)	Punnittu (mg)	Lisätty D2O (ml)	Pitoisuus (mg/ml)
12	3,6	1	3,6
50	5	1	5
150	5,4	1	5,4
270	3,9	1	3,9
670	4	1	3,8
3500	3,3	1	3,3
11900	3,6	1	3,6
Tuntematon	4	1	4

Liuottimena käytettiin raskasta vettä (D2O), sillä myös aiemmat mittaukset oli suoritettu raskaassa vedessä. Punnittuaan dekstraanit 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, lisättiin niihin 1 ml raskasta vettä ja vorteksoitiin, kunnes kaikki kiinteä aines oli liuenneena. Standardien annettiin seistä yön yli.

Seuraavana aamuna, ennen varsinaisten NMR-näytteiden valmistamista, vorteksoitiin eppendorf-putket, jotta voitiin varmistua standardien homogeenisyydestä. Taulukosta 3 käy ilmi standardien pipetointimäärä sekä näytteiden loppupitoisuus. Ylijäämät laimentamattomista standardeista laitettiin -20 °C pakkaseen. Itse näytteitä voitiin säilyttää huoneenlämmössä, sillä dekstraani on hyvin stabiili huoneenlämmössä. [23, s. 28].

Taulukko 3. Dekstraanistandardien valmistus

Standardi (kDa)	Pitoisuus (mg/ml)	Otettu (µl)	Lisätty D2O (µl)	Tilavuus (µl)	Pitoisuus (mg/ml)
12	3,6	167	433	600	1
50	5	120	480	600	1
150	5,4	111	489	600	1
270	3,9	154	446	600	1
670	4	150	450	600	1
3500	3,3	182	418	600	1
11900	3,6	167	433	600	1
Tuntematon	4	150	450	600	1

Lisättiin NMR-putkiin laimennettuja standardeja 4 cm:n verran, tämä vastaa noin 530 µl:n lisäystä. Lisäys mitattiin senttimetreissä siksi, että haluttiin pitää liuoksen määrä mahdollisimman pienenä, jotta voidaan estää mahdollisten laminaarivirtausten syntyminen. Osiossa 2.2 *Diffuusio-erotteinen spektroskopia* havainnollistettiin laminaarivirtauksen vaikutus diffuusiomittaukseen.

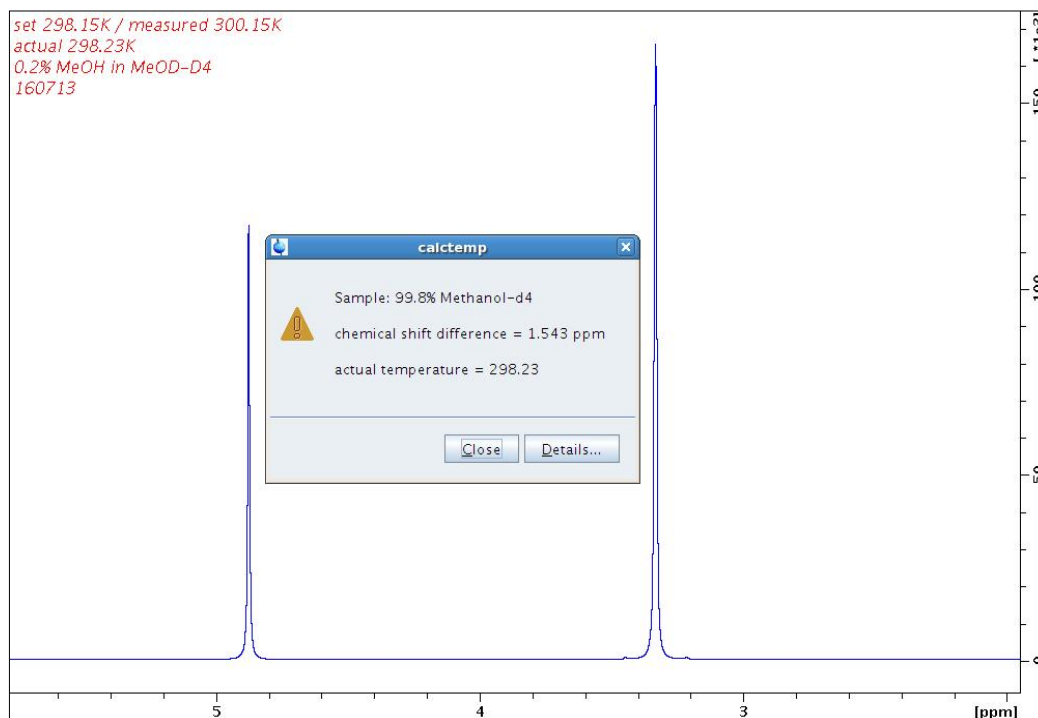
4.2 1d-mittaukset dekstraanille

Ennen varsinaisia DOSY-mittauksia, mitattiin standardeista 1d-spektrit käyttämällä Brukerin *noesygppr1d*-pulssisekvenssiä.

Presaturaatiota, eli liuottimen signaalin vaimentamista, varten kalibroitiin ensiksi mittauslämpötila. Mittaukset suoritettiin 25 °C:ssa (298,15 K), millä haluttiin estää, että veden antama signaali ei vääristä viereisiä piikkejä.

Lämpötila kalibroitiin siten, että otettiin 600 µl deuteroitua metanolia (MeOD-d₄, eli kaikki vedyt on korvattu raskaalla vedyllä) NMR-putkeen, valittiin pulssisekvenssiksi zg30, eli yksinkertainen 1d-sekvenssi joka käyttää 90°:n pulssin sijaan 30°:n pulssia. 30°:n ja 90°:n pulssien ero on herkkyys ja voimakkuus, 90 asteen pulssilla saadaan voimakkaammat signaalit, mutta 30 asteen pulssilla saadaan parempi resoluutio verrattuna 90°:n pulssiin. [24.]

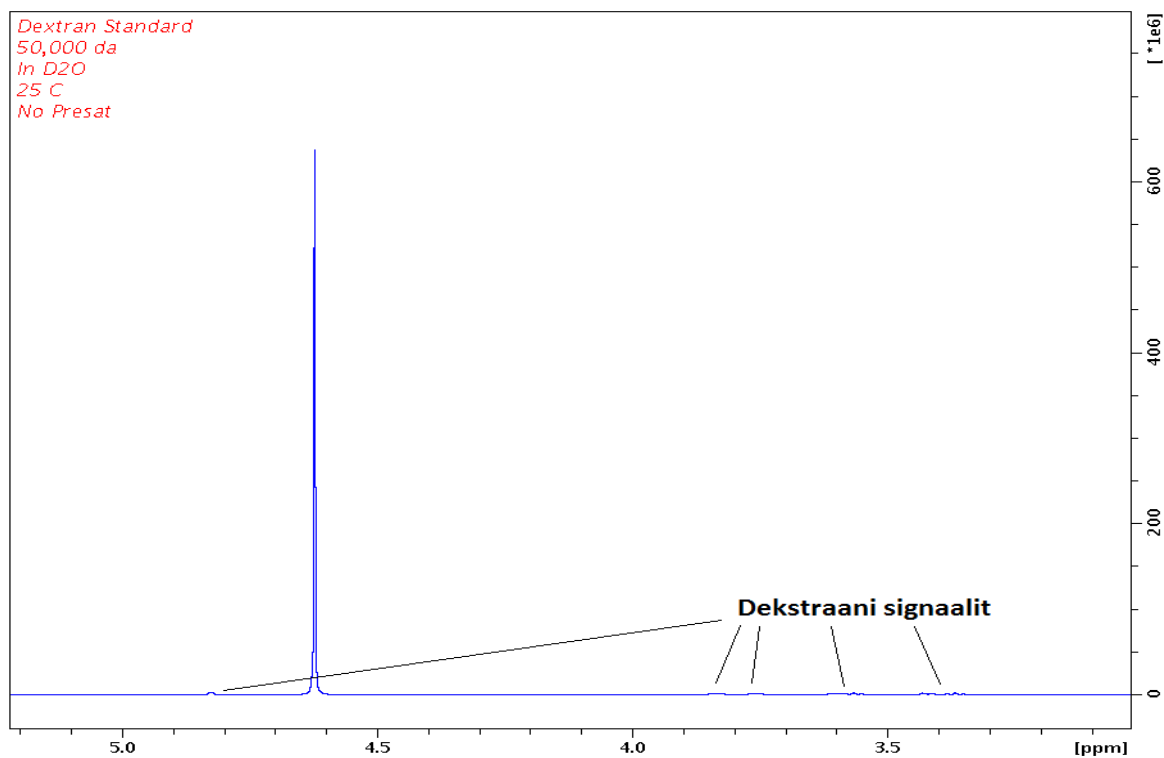
Muut parametrit olivat NS = 1 (*number of scans*, mittausten lukumäärä), DS = 0 (*number of dummy scans*, nolla mittausten määrä). Ajon jälkeen lämpötilan selvittämiseksi käytettiin TopSpin 3.1 -ohjelman omaa sisäänrakennettua "calctemp"-ominaisuutta. Muutettiin lämpötilaa kunnes calctempin ilmoittama lämpötila oli 298,15 K \pm 0,1 K. Kuvassa 10 on havainnollistettu lämpötilan kalibrointi.



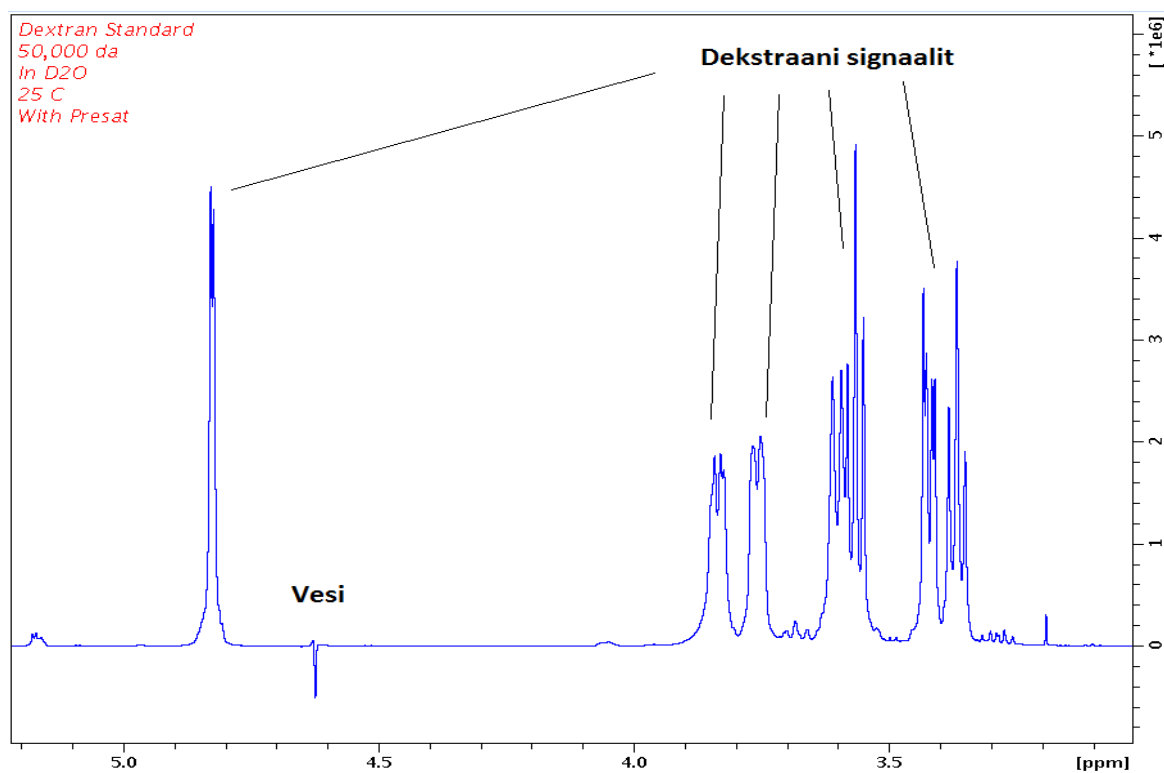
Kuva 10. Lämpötilan kalibrointi käyttäen TopSpin 3.1 -ohjelman omaa lämpötilakalibrointia. Lämpötila on kalibroitu käyttäen deutoitua metanolia. Ohjelma vertaa kahden metanolista tulevan piikin etäisyyttä toisistaan ja laskee erotuksen avulla lämpötilan.

Lämpötilan kalibroinnin jälkeen viritettiin RF-lähettimen paikka (transmitter offset), jotta saataisiin sen avulla vaimennettua veden signaali. Lähettimen paikkaa kuvataan parametrilla O1, ja sen yksikkö on Hz. Mittauslämpötilassa O1 oli 2 826,50 Hz ja spektrin leveys 7 194,245 Hz.

Signaalin vaimentaminen tapahtui siten, että valittiin spektrin keskipiste, eli toisin sanoen +SW/2- (spektrin leveys) ja -SW/2-piste siten, että se oli veden signaalin päällä. Selektiivisellä pulssilla, jolla on pitkä aika ja pieni teho, saadaan hävitettyä signaali. Presaturaatiossa ei Boltzmannin jakauma enää päde, vaan energiatiloilla on tasapopulaatiot. Hyvin viritetyn lähettimen vaimentava alue on hyvin kapea, joten sillä saadaan estettyä veden läheisyydessä olevien piikkien muutoksia. Kuvissa 11 ja 12 on havainnollistettu veden supression vaikutus spektriin.



Kuva 11. Presaturoimattoman 50 kDa:n dekstraanistandardin antama spektri, jossa veden signaali peittää kaiken alleen



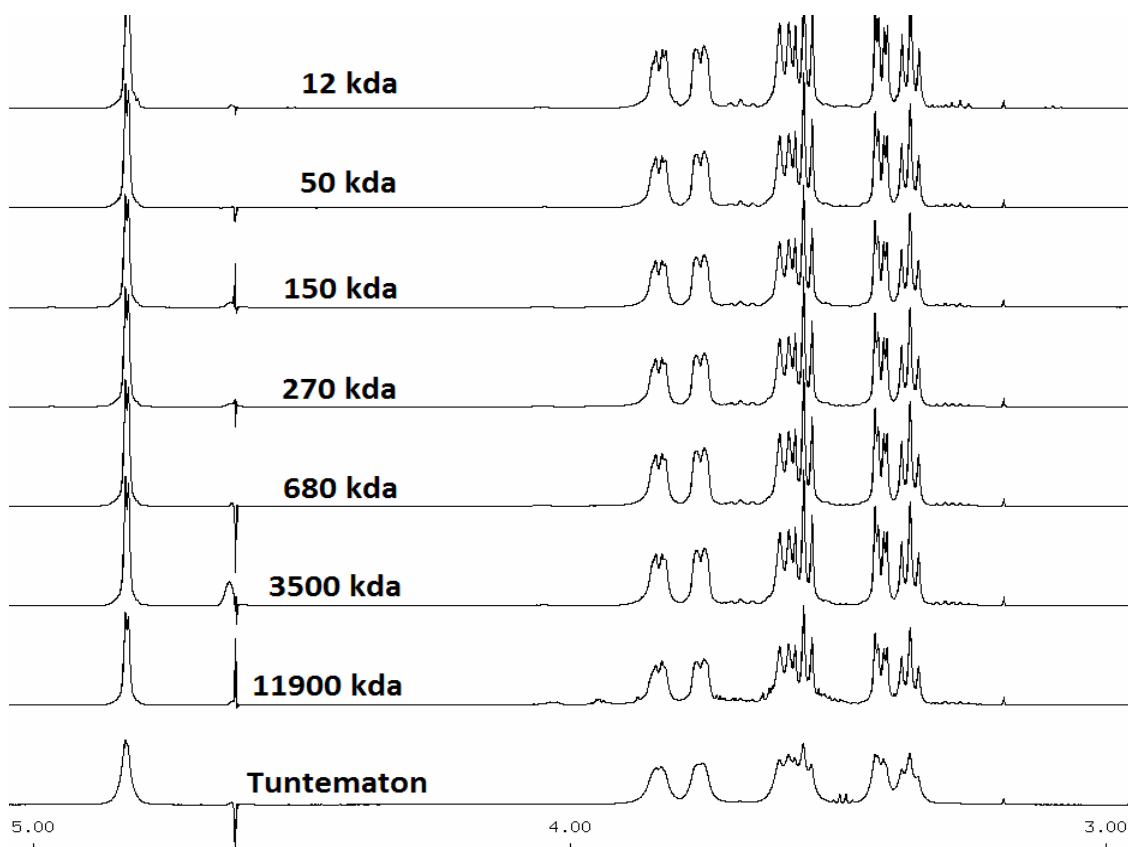
Kuva 12. Presaturoidun 50 kDa:n dekstraanistandardin antama spektri, jossa vaimennetun veden signaali ei häiritse spektriä

Kalibrointien ollessa kunnossa aloitettiin varsinaiset mittaukset. Jokainen dekstraanis-
standardi mitattiin samoilla parametreilla. Taulukkoon 4 on listattu oleelliset mittaus-
parametrit sekä niiden arvot.

Taulukko 4. Oleelliset mittausparametrit dekstraanistandardien 1d-mittauksia varten.

Pulse program	noesygppr1d
Size of fid	65536
Fid resolution	0,219551 Hz
Dummy scans	4
Number of scans	64
Spectral width	7194,245 Hz
Offset frequency	2826,5 Hz
Relaxation delay	4 s

Kuvasta 13 käyvät ilmi eri standardien 1d-spektrit ja niiden samankaltaisuudet, sillä
kyseessä on sama molekyyli rakenne, mutta vain pidempi ketju.



Kuva 13. Eri dekstraanistandardien 1d-noesy-spektrit verrattuna toisiinsa. Huomioitavana tun-
temattoman standardin huono spektri, sekä muiden spektrien samankaltaisuus.

Kuvasta näkyy, kuinka tuntemattoman standardin piikit eivät ole yhtä teräviä kuin muiden, sillä todennäköisesti tuntemattoman standardin liike on merkittävästi rajoittunutta johtuen sen suuresta koosta.

Näihin spektreihin voitiin jälkeenpäin verrata diffuusiomittausten spektrejä, ja tarkistaa että spektrit eivät olleet vääristyneitä.

4.3 Pulssisekvenssin valinta

Seuraavana vaiheena oli diffuusiopulssisekvenssin valinta. Kokeiltiin viittä eri pulssisekvenssiä, nämä olivat *dstebpgp3s(1d)*, *ledbpgp2s(1d)*, *ledbpgppr2s(1d)*, *stebpgp1s(1d)* sekä *stebpgp1s19(1d)*.

ste – *stimulated echoes*, jossa magnetisaatio säilytetään pituussuunnassa, eli z-akselin suuntaisesti jokaisen $90^\circ - 180^\circ - 90^\circ$:n pulssisegmentin jälkeen, jolloin T2-relaksaatio ei tapahdu. Ste:n antaman magnetisaation säilyttämisen avulla voidaan käyttää suurempaa Δ (**d20**) -arvoa, jota rajoittaa vain T1-relaksaatio. (T1 arvo kuvaa aikaa, joka spin-systeemillä kestää palautua termodynaamiseen tasapainoon).

dste – *double stimulated echoes*, jossa sekvenssissä on toistettuna $90^\circ - 180^\circ - 90^\circ$:n pulssi-segmentti. Tällä saadaan kaikkien vakionopeudella liikkuvien molekyylien laminaarivirtaus kompensoitua.

bp – *bipolar gradient pulses*, jossa gradientit vaihdetaan puolessa välissä positiivisista negatiivisiksi 180° :n spin echo pulssin avulla. Tämän avulla saadaan poistettua taustasta johtuvaa häiriötä ja nostettua varsinaisten signaalien intensiteettiä. [25.] Kummankin gradientin pituus on siis $\delta/2$ (p30), ja koko gradientin pituus on δ (p30 * 2).

led – *longitudinal eddy current delay*, jossa sekvenssin lopussa (toiseksi viimeinen 90° :n pulssi) magnetisaatio tallennetaan Z-akselille, jonka jälkeen syötetään *spoil gradientti*, jolla saadaan xy-tasossa olevat magnetisaatiot poistettua. Pyörrevirrat saadaan poistettua antamalla tarpeeksi pitkä viivearvo (**d21**), jolloin pyörrevirtojen vaikutus saadaan poistettua. Tämän avulla viimeisen 90° :n pulssin jälkeen saadaan mitattua FID ilman pyörrevirtojen vaikutusta.

gp – using gradients, käyttäen gradientteja, jotka ovat oleellinen osa diffuusiomittauksissa.

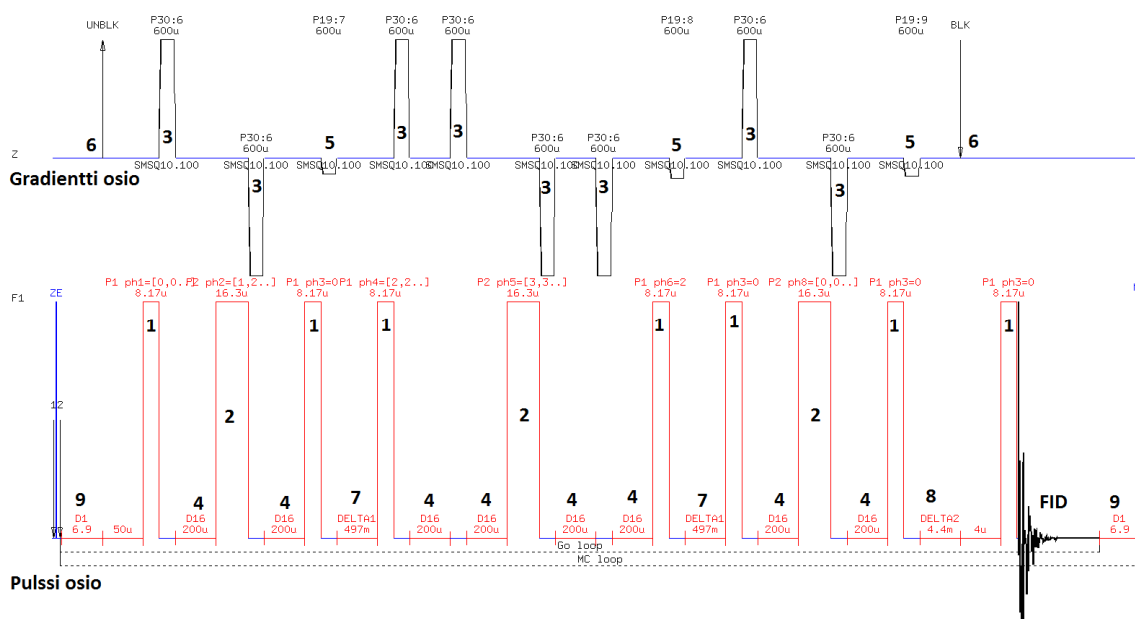
pr – presaturation, presaturaatio on liuottimen signaalin vaimentamista, tässä tapauksessa veden. Presaturaation toimintaperiaate kerrottiin lämpötilan kalibroinnin yhteydessä.

1s/2s/3s – number of spoil gradients, spoil gradientit ovat ns. korjausgradientteja. Niiden avulla saadaan säilytettyä halutut signaalit, ja poistettua ei-halutut signaalit. [26, s.12.]

19 – 3-9-19 (Watergate), vedensuppressio sekvenssi, jolla saadaan vaimennettua veden signaali.

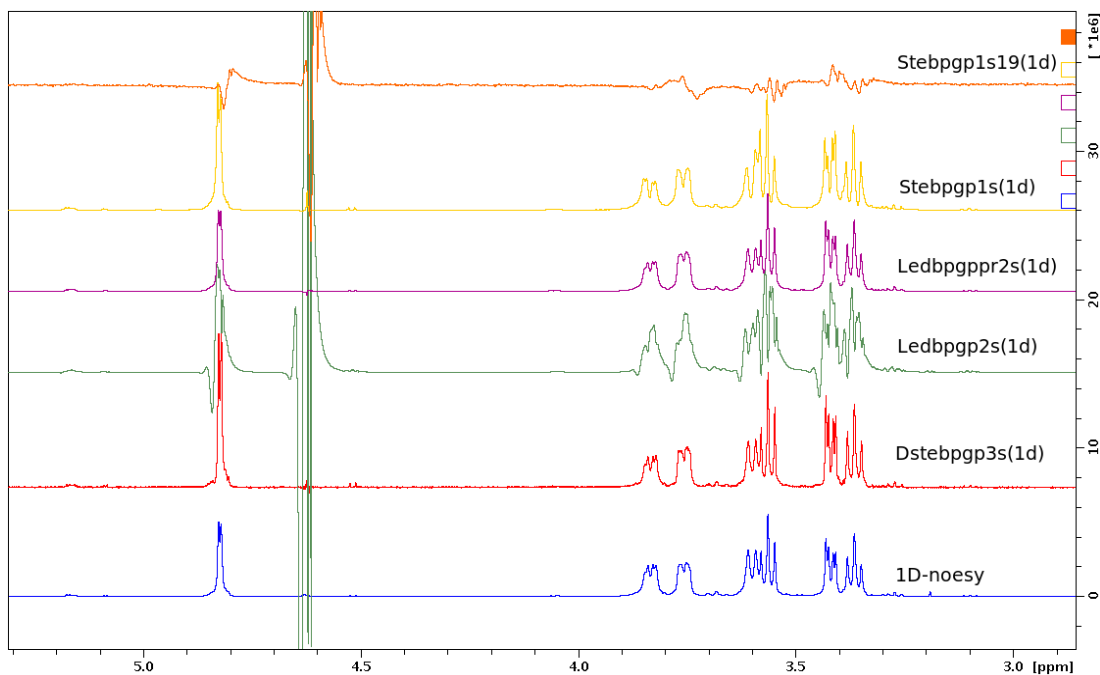
1d – kyseisen pulssisekvenssin 1d versio.

Kun oli kokeiltu jokaista edellä mainittua pulssisekvenssiä, päädyttiin lopulta valitsemaan *dstebpgp3s(1d)*-sekvenssi. Edellisissä mittauksissa Varian laitteella, oli käytetty samaa sekvenssiä. Kuvassa 14 on havainnollistettu kyseinen pulssisekvenssi.



Kuva 14. Dekstraaneille käytetty dstebpgp3s-pulssisekvenssi, joka on jaettuna kahteen osaan, gradientit sekä pulssit. Kuvan selite: **1** - 90°:n pulssi, **2** - 180°:n pulssi, **3** - gradientti, **4** - viive gradienttien palautumiselle, **5** - spoil gradientti, **6** - gradienttiosion alku- sekä loppupiste, **7** - delta 1, diffuusioviive, **8** - delta 2, diffuusioviive, **9** - relaksaatioaika, jonka aikana annetaan yhdisteiden palautua normaaliin tilaan, **FID** - Mittaus tapahtuu tässä vaiheessa.

Vertailun vuoksi kuvassa 15 on eri pulssisekvenssien vaikutus verrattuna 1d-noesy-spektriin.



Kuva 15. Kuuden eri pulssisekvenssin spektrit havainnollistettuna. Huomioitavana stebpgp1s19- sekä ledbpgp2s-sekvenssien vääristyneet spektrit.

Kuvan perusteella, sekvenssit *dstepbpgp3s(1d)*, *ledbpgppr2s(1d)*, ja *stepbpgp1s(1d)* muistuttavat 1d-noesy spektriä. *Stepbpgp1s19(1d)* sekvenssiä käyttäessä on supressio ollut liian voimakasta, joka on vääristänyt spektriä. *Ledbpgp2s(1d)* spektrissä ilmenee vaihevirhettä, aiheesta kerrotaan lisää osiossa 5.1 Lukon vaihevirhe.

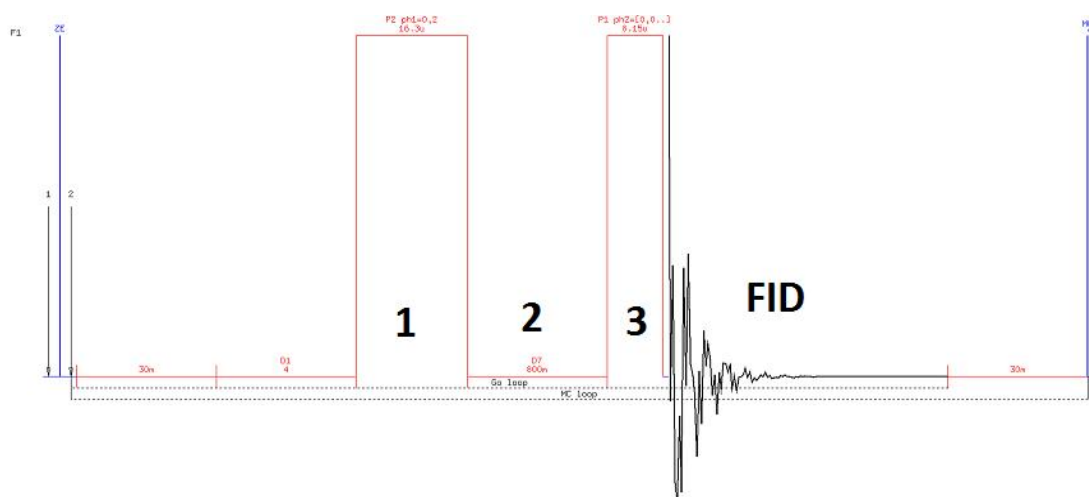
4.4 Dekstraanistandardien mittaussparametrien optimointi

Kun pulssisekvenssi oli valittu, oli seuraavaksi vuorossa sekvenssin parametrien optimointi.

Diffuusiolle oleelliset parametrit ovat D20 (iso delta) sekä p30 (pikku delta). Muut tärkeät parametrit ovat mm. ns (scanien lukumäärä), ds (nolla-scanien lukumäärä), gpz6 (gradientin voimakkuus), rg (*reciever gain*, vastaanottimelle tulevan signaalin vahvistus), sekä d1 (relaksaatioviive).

Koska D20-arvoa rajoittaa yhdisteen T1-arvo (relaksaatiovakio), eli se kuinka nopeasti yhdiste palautuu normaalitasolle virityksen jälkeen, jouduttiin selvittämään T1 ensin, sillä D20:n tulisi olla pienempi kuin yhdisteen T1-arvo. [27, s. 3.]

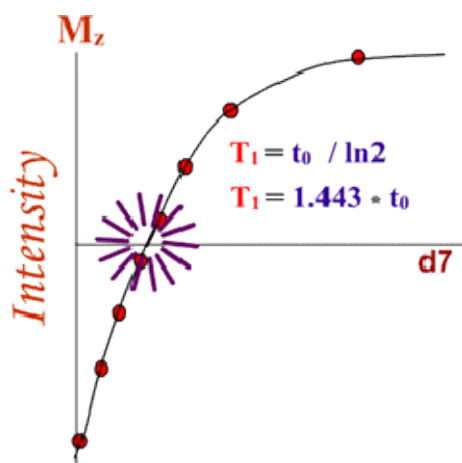
T1 arvon selvittämistä varten suoritettiin inversion-recovery koe, käyttämällä T1ir1d-pulssisekvenssiä (kuva 16).



Kuva 16. T1ir1d-pulssisekvenssi, jota käytettiin T1-arvon selvittämiseksi

Kuvan sekvenssissä magnetisaatio käännetään vastakkaissuuntaiseksi 180° :n pulssin avulla (1), jota seuraa viive $d7$ (2) (*delay for inversion recovery*, magnetisaation palautumiseen vaadittava viive). Viiveen jälkeen syötetään 90° :n pulssi (3), jonka avulla käännetään z-akselin magnetisaatio xy-tasolle signaalin detektointia varten. Detektoidun signaalin vaihe sekä intensiteetti riippuvat 180 sekä 90° :n pulssien välisen ajan pituudesta, eli toisin sanoen $d7$ -arvon suuruudesta. [28, s.116.]

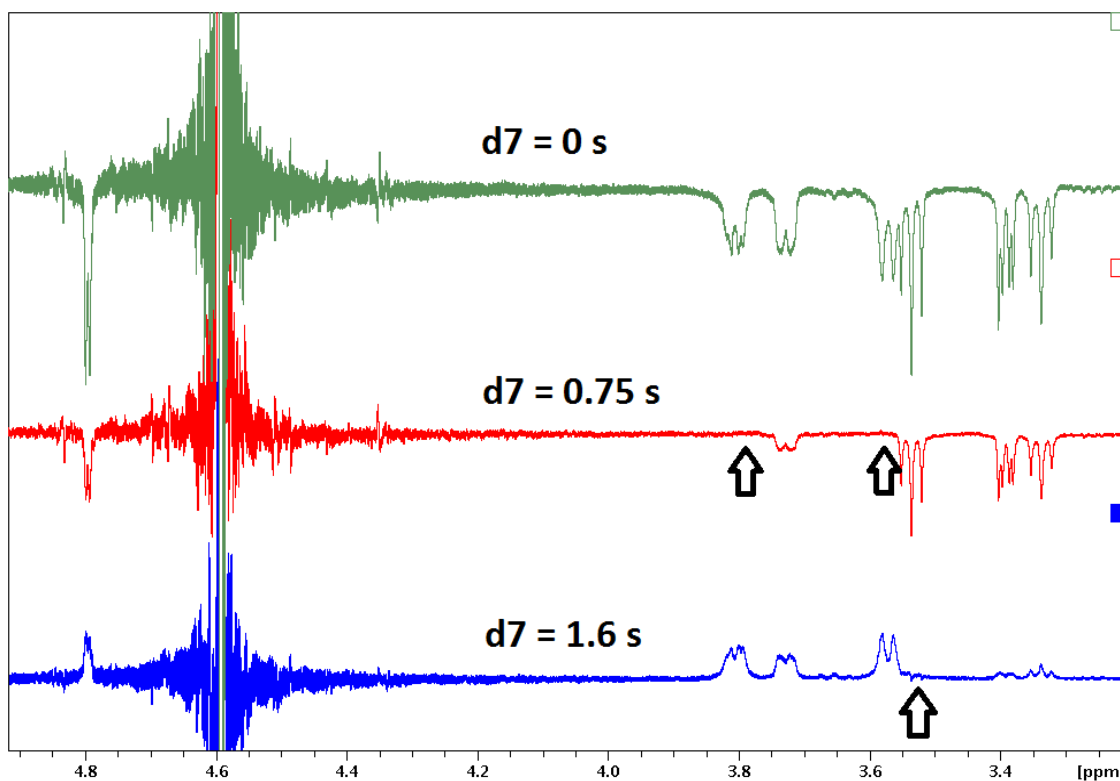
Optimoidun $d7$ -arvon vaikutuksena on tutkittavan signaalin intensiteetti nolla, kuten kuvasta 17 näkyy.



Kuva 17. Optimoidun $d7$ -arvon vaikutus intensiteettiin. [29]

Mitatun $d7$ -arvon avulla voidaan arvioida T_1 käyttäen kuvassa 17 näkyvää kaavaa, jossa t_0 on $d7$ -arvo.

Suoritettiin ensiksi nopea koe, jotta saataisiin selville karkeasti T_1 -arvo käyttämällä edellä mainittua T_1 ir1d-pulssisekvenssiä. Kyseisen kokeen $ns = 1$, ja ainoa parametri jota muutettiin, oli $d7$ -arvo. Aloitettiin nollasta sekunnista, ja ajettiin spektri. Muutettiin spektrin vaihetta siten että piikit olivat negatiivisia. Nostettiin $d7$ -arvoa asteittain ylöspäin, kunnes jokainen piikki saavutti tai ylitti nollaintensiteetin. Kuvassa 18 on havainnollistettu tämä vaihe, jossa nuolet osoittavat katoavaa piikkiä.



Kuva 18. T1 ρ 1d-pulssisekvenssin spektrit 12 kDa dekstraanistandardista, näissä ainoa muutettu parametri on d7-arvo.

Käyttäen kuvan 17 kaavaa, saatiin maksimi T1-arvoksi noin 2,3 s ($1,443 \cdot 1,6$ s).

Karsittiin T1 ρ 1d-sekvenssistä 1d-osio pois, ja suoritettiin pseudo- 2d-koe. Koetta varten käytettiin TopSpin-ohjelman omaa menettelyohjetta. [30.]

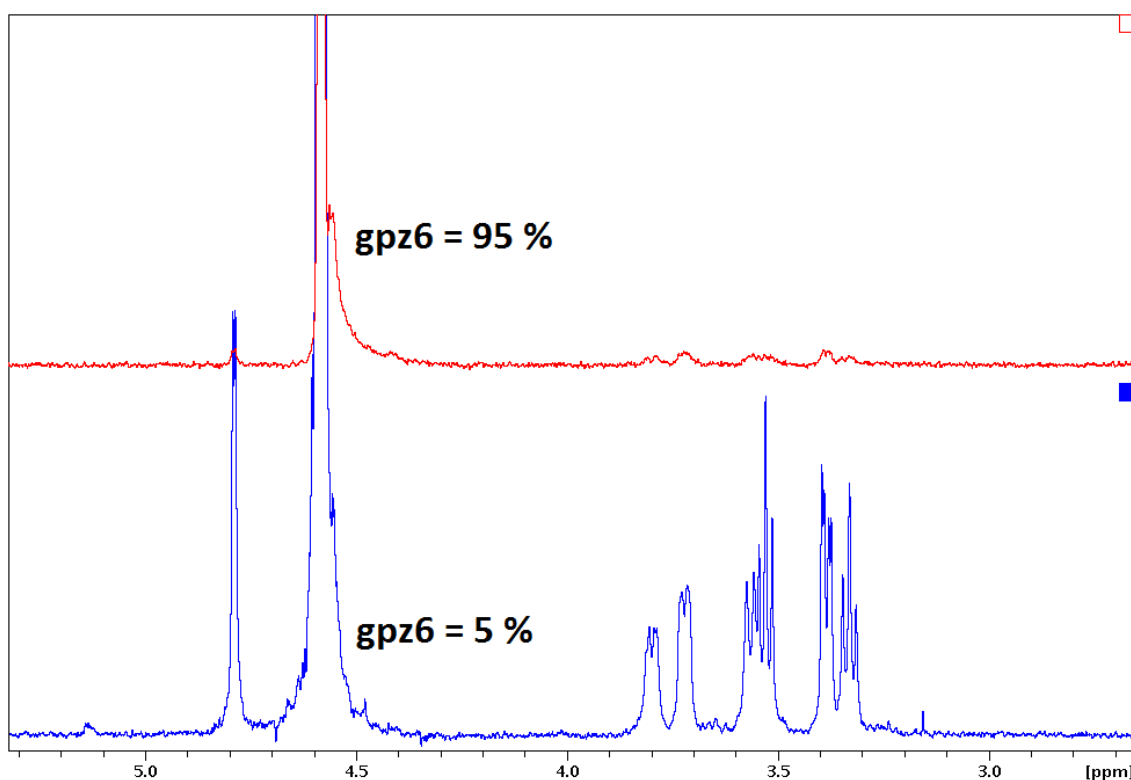
Ohjeen mukaisesti säädettiin D1-arvo siten että se oli viisi kertaa suurempi kuin yhdisteen pisin T1 aika (2,3 s), eli 11,5 s. Kyseisen kokeen avulla saatiin selville jokaisen protonin T1. Taulukkoon 5 on listattu dekstraanin eri spin-systeemien T1-arvot, käyttäen hyväksi 12 kDa:n sekä 11 900:n kDa standardeista saatua mittausdataa.

Taulukko 5. 12 kDa:n sekä 11900 kDa:n dekstraanistandardien spin-systeemien T1-arvot verrattuna toisiinsa.

Peak	(ppm)	3,340	3,534	3,712	3,799	4,798
12 kDa	T1 (s)	2,13	2,47	1,53	1,01	1,87
11900 kDa	T1 (s)	2,15	2,39	1,64	1,26	1,91

Taulukosta 5 huomataan, että relaksaatioajat ovat poikkeuksellisesti liki samat pienimmän sekä suurimman standardin kesken, sekä 12 kDa:n standardin 3,799 ppm:n piikistä nähdään D20-parametrin maksimiarvo (1 s).

Seuraavana vaiheena oli itse diffuusioparametrien optimointi, eli arvot D20 sekä p30. Diffuusioon käytettiin aiemmin valittua pulssisekvenssiä dstebpgp3s(1d). Jokaiselle standardille suoritettiin kaksi ajoa, jotka olivat identtisiä lukuun ottamatta gpz6 (gradientin voimakkuus) -parametrin arvoa. Ensimmäisen ajon gpz6 arvo oli 5 %, toisen 95 %, tämän avulla saatiin nopeasti tarkasteltua diffuusiokokeen alku sekä loppupiste. Myöhemmin suoritettujen diffuusiokokeiden gradienttien alkuvoimakkuudet ovat 5 % ja loppuvoimakkuudet 95 %, joten näiden kahden ajon perusteella voidaan saada optimi-parametrit selvitettyä nopeasti. Täten gpz6 (95 %) ajon intensiteettien ollessa noin 5 - 10 % gpz6 (5 %) ajon intensiteeteistä, ovat diffuusioparametrit optimaaliset. Kuvassa 19 on havainnollistettu optimoitujen parametrien vaikutusta spektriin.



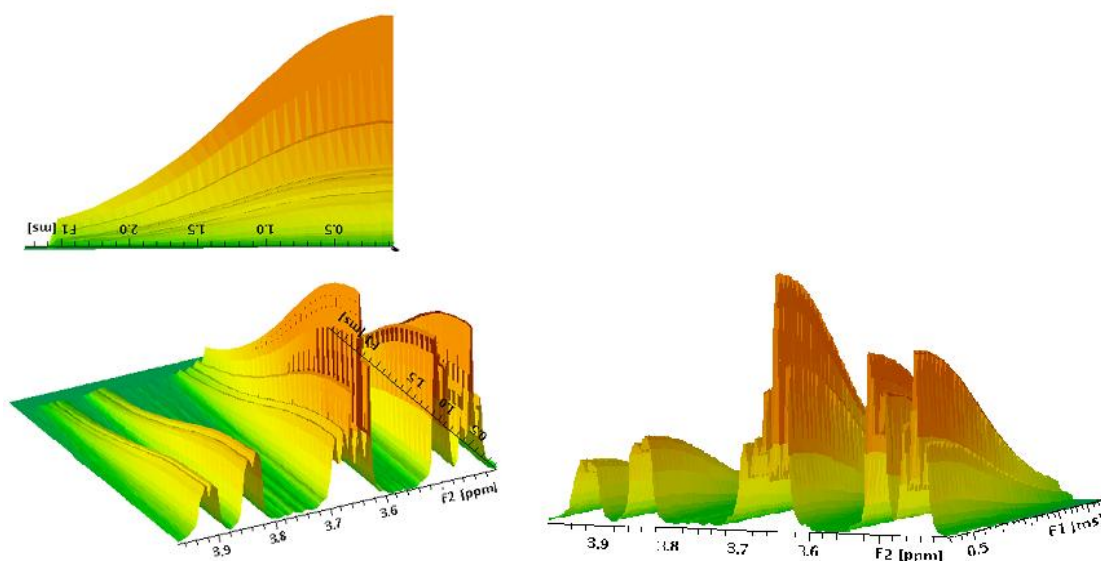
Kuva 19. Gpz6:n 95 % sekä 5 % spektrit verrattuna toisiinsa, tässä gpz6 (95 %):n spektrin intensiteetti on noin 6 % gpz6 (5 %):n spektristä.

Taulukkoon 6 on listattu standardit sekä niiden optimoidut parametrit. D20-arvo haluttiin pitää vakiona muuttaen ainoastaan p30-arvoa, sillä diffuusion intensiteetti -yhtälön (yhtälö 4) kautta nähdään, että gradientin pituudella (p30) on suurempi vaikutus intensiteettiin kuin diffuusioon käytetyllä ajalla (d20).

Taulukko 6. Standardien mittauksissa käytetyt diffuusioarvot, jossa d20-parametria pidettiin vakiona (1 s).

Standardi (kDa)	D20 (s)	P30 (μs)
12	1	600
50	1	850
150	1	1000
270	1	1250
670	1	1600
3500	1	2000
11900	1	3930
Tuntematon	1	5000

Valittujen parametrien jälkeen siirryttiin pulssisekvenssin 2d-versioon, ja suoritettiin nopeat tarkistusmittaukset jossa $ns = 1$. Mittauksien avulla pystyttiin näkemään, onko signaalin vaimentuminen puhdasta. Mittaukset suoritettiin käyttämällä TopSpinin komentoriviä. Komennolla dosy 5 95 32 l y suoritettiin mittaukset, jossa dosy on avauskomento, 5 on ensimmäisen gradientin arvo, 95 viimeisen gradientin arvo, 32 on gradienttiasteiden määrä (32 gradienttiastetta, joista ensimmäinen on 5 % ja viimeinen 95 %), l tarkoittaa lineaarista gradienttiramppia ja y-osiolla käynnistetään mittaus. Mittauksien jälkeen voitiin tarkistella signaalin vaimentumista, kuvassa 20 on dekstraani 270 kDa:n spektri kuvattuna eri suunnista.



Kuva 20. 270 kDa:n standardin vaimentumista kuvattuna eri suunnista. Vaimentumisessa säilyy piikkien muoto intensiteetin pienentyessä.

4.5 Dekstraanistandardien mittaus sekä prosessointi

Optimoitujen parametrien jälkeen suoritettiin todelliset mittaukset dekstraanistandardeille. Käytettiin taulukossa 6 esitettyjä diffuusioparametreja, nostettiin ds arvoon 8, jotta gradientista johtuva lämpenemisen ehtii tasaantua. Ns nostettiin arvoon 32, jotta saataisiin parempi signaali/kohinasuhde, tämä myös pidensi ajon pituutta muutamasta minuutista neljään tuntiin. $F2$ -ulottuvuuden (kemiallinen siirtymä) datapisteiden määräksi valittiin 32k, ja $F1$ -ulottuvuuden (diffuusio) 32 (sama kuin ns -arvo).

Mittauksen suoritettiin kolmen viikon aikana. Ennen jokaista näytettä jouduttiin optimoimaan olosuhteet. Tämä tarkoitti lämpötilan sekä lähettimen kalibrointia. Suoritettiin myös loopadj-komento (jolla optimoitiin lukon parametrit) jokaiselle näytteelle. Taulukoon 7 on kerätty loopadj-komennolla saadut lukon parametrit loop filter, gain sekä time. Loopadj-komennosta kerrotaan osiossa 5.1 *Lukon vaihevirhe*.

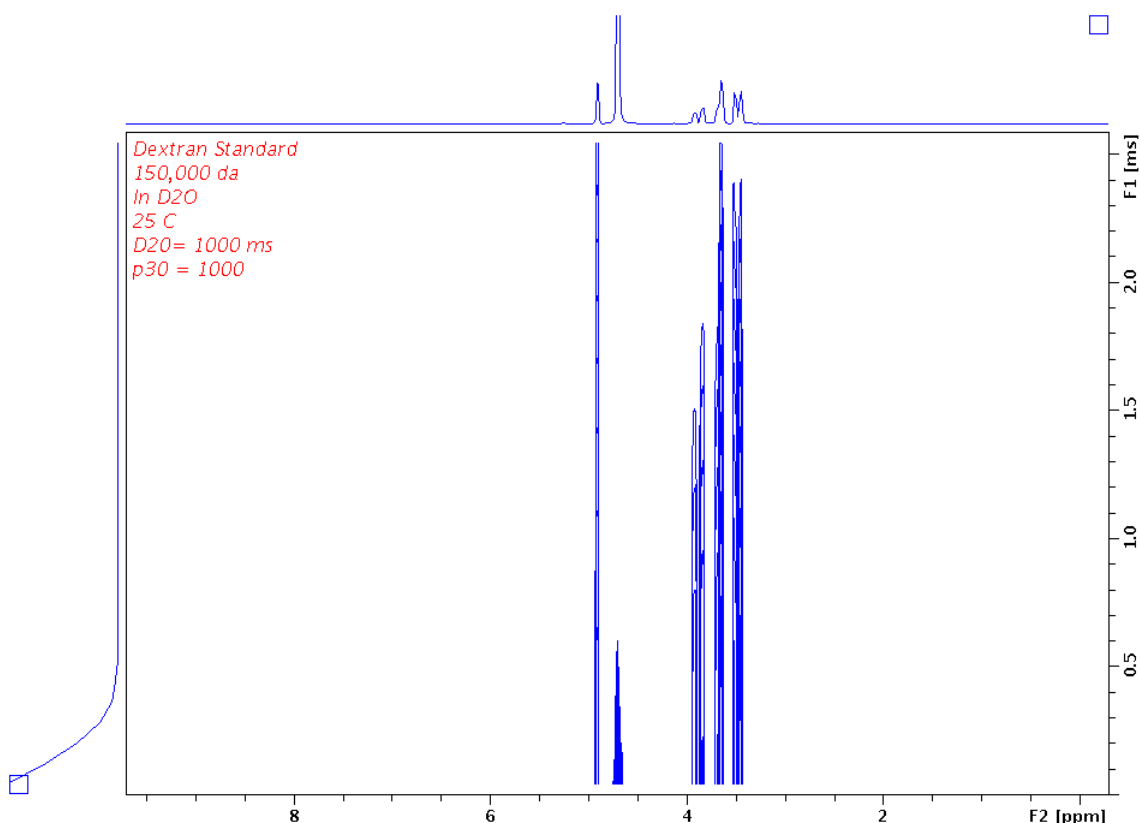
Taulukko 7. Loopadj-komennolla saadut arvot eri standardeille.

Standardi (kDa)	12	50	150	270	680	3500	11900	Tuntematon
Filter (Hz)	348	362	334	353	367	383	348	343
Gain (db)	6,19	6,47	5,91	6,28	6,56	6,84	6,19	6,09
Time (s)	0,12	0,12	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12

Mittauksien työvaiheet olivat seuraavanlaiset. Syötettiin NMR-putki manuaalisesti laitteeseen, annettiin lämpötilan tasaantua 5 min ajan. Lukittiin näyte D₂O:lla, RF-piiri viritettiin ko. taajuudelle ja näytteelle. Tähän käytettiin TopSpin ohjelman automaattista tune and match -toimintoa, käytettiin myös automaattista shimmaustoimintoa. Shimmauksen jälkeen käytettiin pulsecal-komentoa 90 sekä 180°:n pulssien kalibroimiseen, minkä jälkeen suoritettiin loopadj-komento ja syötettiin lukkotaulukkoon uudet filtergain- sekä time-arvot. Näiden vaiheiden jälkeen voitiin käynnistää mittaukset käyttämällä dosy 2 95 32 l y y -komentoa, viimeisellä y-parametrilla suoritettiin automaattinen rga (reciever gain) optimointi.

Spektrien prosessointia varten muutettiin TopSpin ohjelman ProcPars-osiosta spektrin pohjaviivaa koskevat arvot, absf1 = (1000, 1000), absf2 = (-1000, -1000), absg = 0, sekä PH_mod[f2] = pk. Näiden avulla saadaan polynomisesti korjattua pohjaviivan vääristykset.

Prosessoinnin työvaiheet olivat seuraavanlaiset. Aloitettiin xf2-komennolla, jolla prosessoitiin Fourier-muunnoksella F2-ulottuvuuden data. Xf2-komentoa seuraa abs2-komento, jolla korjattiin pohjaviiva F2-ulottuvuudessa, tämän jälkeen korjattiin mahdolliset vaihevirheet. Vaihekorjaus suoritettiin ainoastaan ensimmäisessä gradienttivaiheessa. Kuvassa 21 havainnollistetaan, miltä kyseinen vaihe prosessoinnissa näyttää.

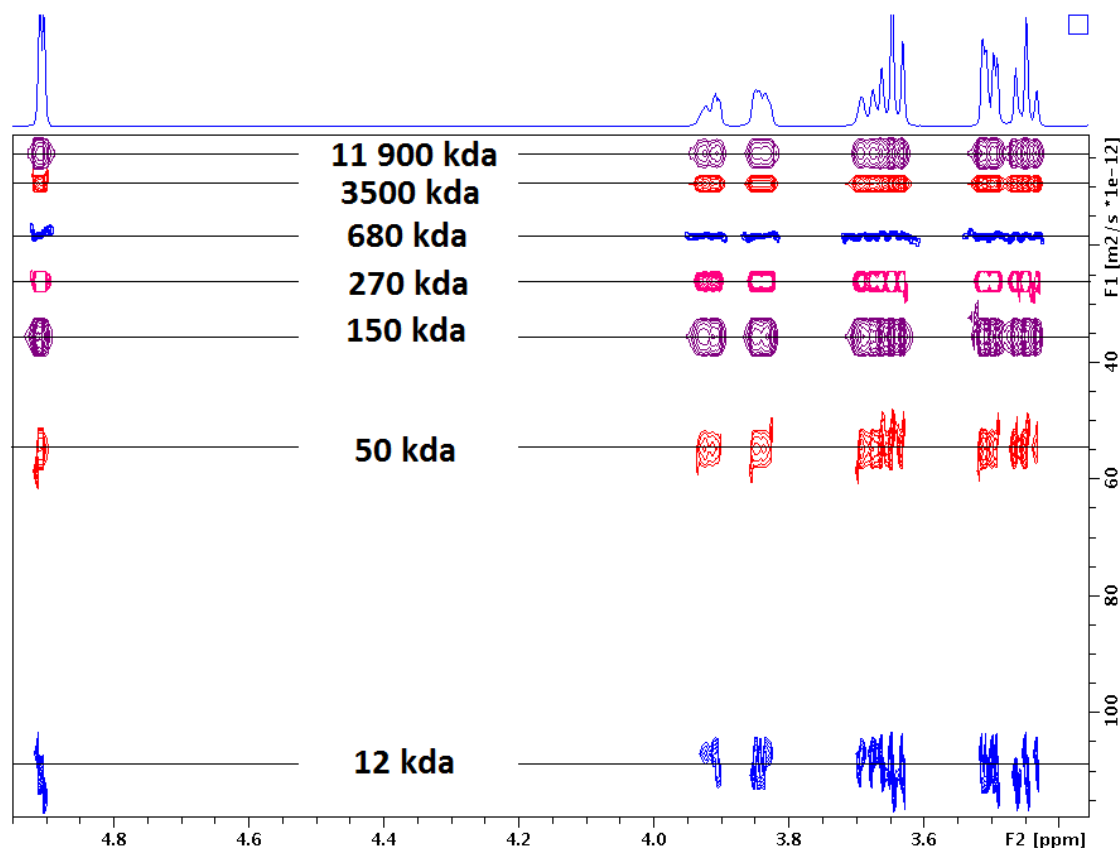


Kuva 21. Xf2- sekä abs2-komentojen jälkeinen tilanne 150 kDa:n standardin prosessoinnissa. Kuvassa on sama tilanne kuin kuvassa 11, mutta päältäpäin katsottuna, kuvasta ei näy signaalin vaimentumista.

Setdiffparm-komennolla syötetään ajon D20- sekä p30-arvot muistiin DOSY-prosessointia varten. Jos vaiheen jättää väliin, tulee spektrin diffuusiovakio olemaan virheellinen, sillä vakio lasketaan kyseisten arvojen avulla. Käyttämällä eddosy-komentoa saadaan suurin vaikutus spektriin, kyseisellä komennolla avataan ikkuna, jossa on lista erilaisia prosessointiparametreja. Dekstraanistandardeja varten muutettiin ainoastaan scaling-parametri logaritmisesta asteikosta lineaariselle asteikolle, jotta voidaan suoraan lukea diffuusiovakio.

Toisin kuin Fourier-muunnoksessa, jossa spektrin ylä- ja alataajuusrajat ovat valmiiksi määriteltyinä spektrin prosessoinnissa, joudutaan diffuusion sovittelussa määrittämään tutkittava alue. Dosy2d setup -komentoa käyttämällä saatiin rajat määritettyä automaattisesti. Tyypillisesti pienten molekyylien näkyvät $1 \cdot 10^{-8}$ ja $1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ välisellä alueella. [14, s.15.]

Itse prosessointi suoritetaan dosy2d-komennolla. Tämän seurauksena saadaan 2d DOSY-spektri, jossa kemialliset siirtymät sijaitsevat F2-ulottuvuudessa, ja diffuusiovakiot F1-ulottuvuudessa. Kuvassa 22 on havainnollistettu, miltä dekstraanin 2d DOSY-spektri näyttää, eri ajoista saadut tulokset on asetettu yhteen spektriin.



Kuva 22. Kuvassa on otettu pohjaksi 12 kDa:n spektri, jonka päälle on lisätty muiden standardien spektrit. Tämän avulla saadaan tarkasteltua kaikkia spektrejä samaan aikaan.

Kuten kuvasta 22 näkyy, diffuusiovakio riippuu standardin koosta. Kuvasta puuttuu tuntematon standardi, sillä kyseistä standardia ei onnistuttu mittaamaan. Syystä kerrotaan osiossa 5.2 *Rajoittava teho*.

Dekstraanistandardien tulokset käsitellään osiossa 6 *Tulokset*.

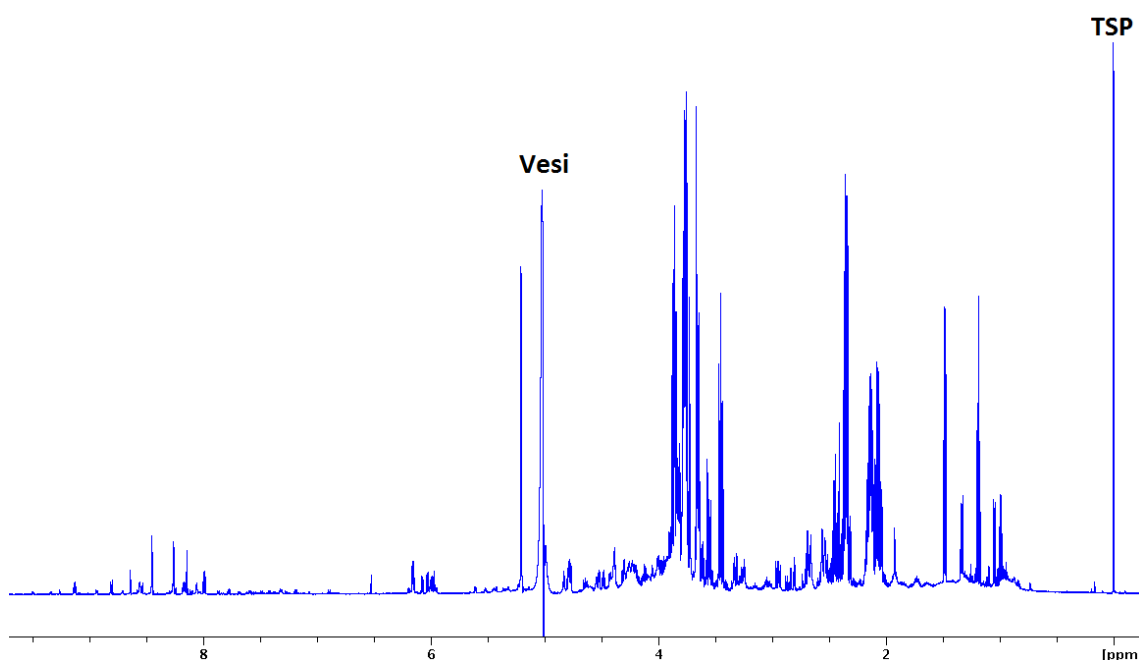
4.6 Hiivan mittausparametrien optimointi

Toisin kuin dekstraanimittauksissa, hiivan mittaukset suoritettiin +6 °C:ssa, tämän avulla parannettiin näytteen säilymistä. Kokeiltiin aluksi mitata hiivanäyte (fraktio 14/9) +25 °C:ssa, mutta todettiin että näyte ei säilynyt kovin hyvin, vaan siinä tapahtui sekundaarisia reaktioita lämpenemisestä johtuen. Hajonnutta hiivanäytettä käytettiin alustavien

parametrien selvittämiseen, joita sitten parannettiin varsinaisella näytteellä (fraktio 14/8).

Hiivanäytteet (fraktiot 14/8 sekä 14/9) oli valmistettu 14.6.2005, ja niitä oli säilytetty -80 °C:n pakkasessa.

Aloitettiin optimointi 1d-noesy-mittauksella fraktiosta 14/9 (kuva 23). Mittausta varten selvitettiin ensiksi lähettimen oikea paikka presaturaatiota varten. Lähettimen paikka oli 2817,9 Hz ja spektrin leveys on 20,0349 ppm.



Kuva 23. Hiivaekstraktin 14/9 fraktiosta ajettu 1d-noesy-spektri. Ekstraktiin on lisätty 45 mmol TSP:tä sisäiseksi standardiksi.

Kuvasta näkee, kuinka monimutkainen näyte on kyseessä, verrattuna dekstraanin muutamaan piikkiin.

Myös hiivanäytteelle suoritettiin osiossa 4.4 *Dekstraanistandardien mittausparametrien optimointi* tehty T1-arvon selvittäminen. Minimi d7-arvoksi saatiin 0,8 s jota vastaa T1-arvo 1,15 s, maksimi d7:ksi saatiin 1,4 s jota vastaa T1-arvo 2,02 s

.

Toisin kuin dekstraaneille, hiivanäytteelle ei suoritettu pseudo- 2d-koetta. Sillä haluttiin vain erottaa hiivaekstraktin yhdisteet toisistaan, eikä selvittää niiden tarkkaa difuusiovakiota. Karkea T1-arvon selvittäminen oli siis riittävää tähän tarkoitukseen.

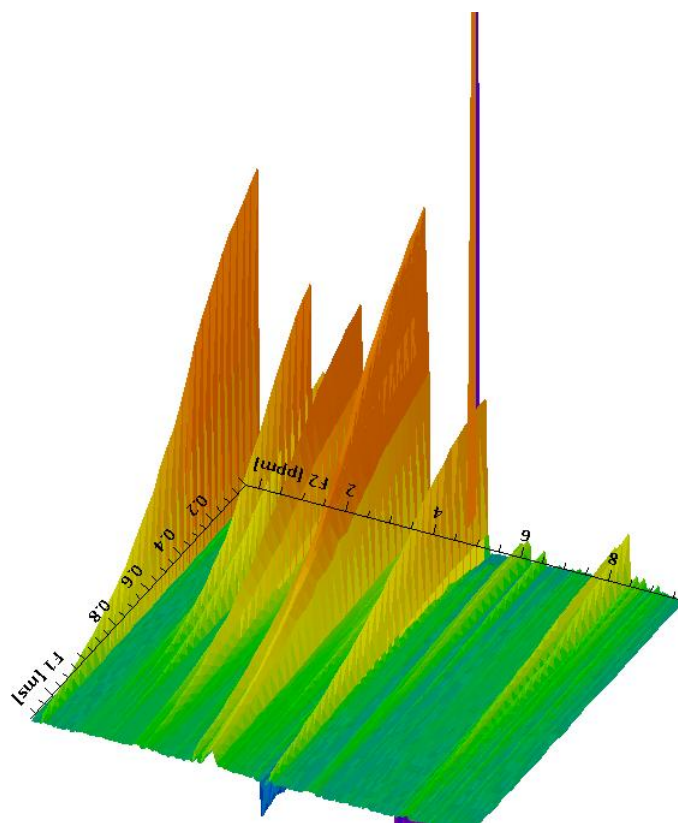
Taulukkoon 8 on kerätty optimoidut diffuusioparametrit mukaan lukien loopadj-komennon avulla saadut arvot.

Taulukko 8. Valitut parametrit hiiva-ekstraktin diffuusiokoetta varten, mukaan on lisätty loopadj-komennolla saadut arvot.

D20 (s)	0,5
p30 (μs)	600
D1 (s)	10
Filter (Hz)	249
Gain (db)	3,86
Time (s)	0,16

Suoritettiin nopea tarkastusmittaus fraktiolle 14/8, jotta nähtiin, onko parametrit optimoitu kyseiselle näytteelle. Kuten kuvasta 25 käy ilmi, niin signaalin vaimentuminen näyttää hyvältä, sekä heikoimmat että voimakkaimmat signaalit ovat vaimentuneet hyvin. Noin 5,5 ppm:n kohdalla näkyy voimakas piikki. Tämä johtuu veden epätäydellisestä supressiosta, joka oli odotettavissa.

YeastSRS 14/08
14.06.2005
In D2O
6 C
D1 = 10s
D20 = 0.5s
P30 = 600μs
13.09.2013 mitattu



Kuva 25. Hiivaekstraktin signaalin vaimentuminen. Huomioitavana noin 5,5 ppm:n kohdalla voimakas veden piikki.

4.7 Hiivan mittaus sekä prosessointi

Kuten kuvan 25 signaalien vaimentumisesta näkyy, ovat joidenkin piikkien intensiteetit hyvin pieniä, joten jouduttiin nostamaan *number of scans* -määrää 32:sta 128:aan herkkyyden parantamiseksi, tämä puolestaan nosti ajon pituutta 4:stä tunnista 32:een. Suoritettiin samat esivalmisteluvaiheet kuin dekstraanien mittauksissa. Ajettiin näyte käyttämällä komentoa dosy 2 95 32 l y y.

Toisin kuin dekstraanin prosessoinnissa, jossa voitiin pitää parametrien oletusarvot, jouduttiin hiivanäytteelle hakemaan sopivat parametrit. Taulukkoon 9 on listattu käytetyt prosessointiparametrit sekä diffuusioprosessointiparametrit.

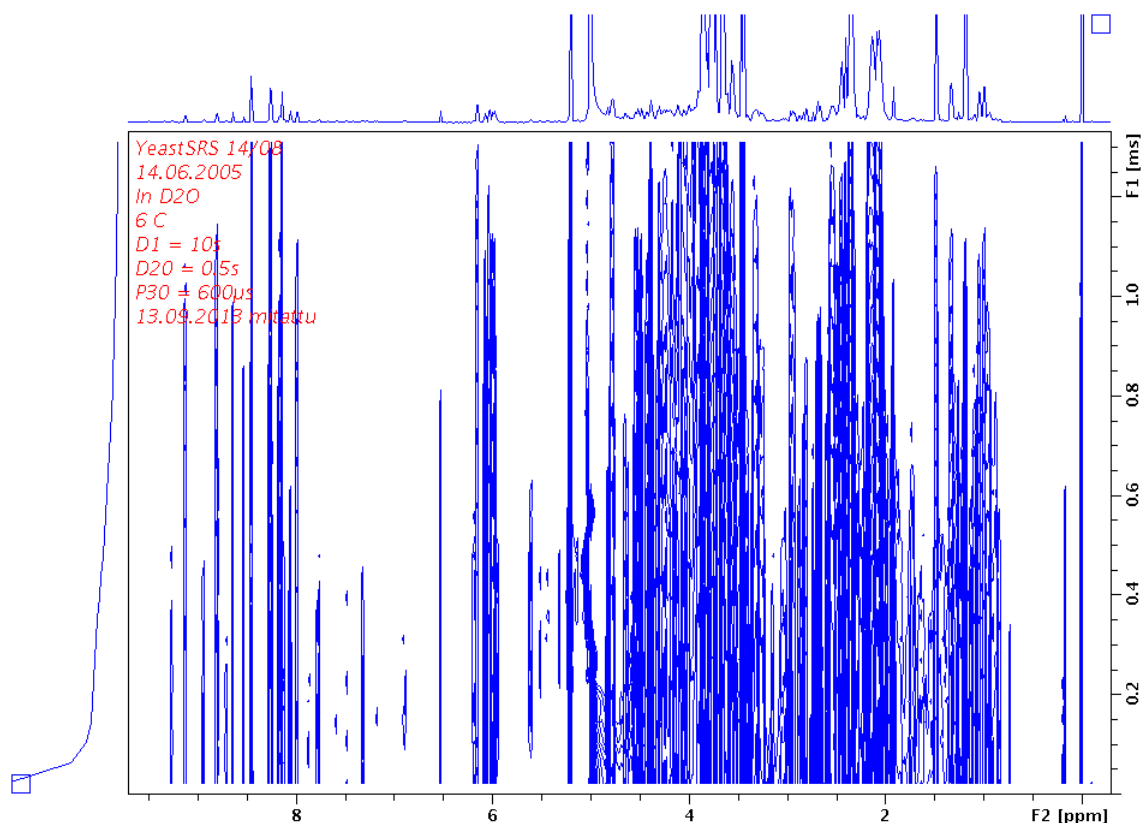
Optimiprosessointiparametreja etsiessä jouduttiin useaan otteeseen aloittamaan prosessointi alusta. Kyseessä oli suurimmalta osalta hakuammunta, sillä jonkin arvon vaikutusta ei voitu suoraan nähdä spektristä, vaan arvon muuttaminen vaati spektrin uudelleenprosessoimisen. Merkittävin muutos parametreissa, verrattuna dekstraanin prosessointiin, ovat SI (F2)- sekä SI (F1) -arvot. SI-arvolla tarkoitetaan prosessoidun datan määrää, tässä tapauksessa 2048 datapistettä F2-ulottuvuudessa ja 256 datapistettä F1-ulottuvuudessa, todellisten datapisteiden ollessa 32768 F2-ulottuvuudessa ja 32 F1-ulottuvuudessa. F2-ulottuvuuden datapisteiden pienen määrän avulla saadaan nopeutettua prosessointiaikaa uhraamalla näennäistä herkkyyttä, sillä prosessoitaessa ohjelma ei lue jokaista datapistettä, vaan joka 16. datapisteen.

F1-ulottuvuuden näennäistä resoluutiota on parannettu ns. zero-filling -menetelmällä, jossa FID:n loppuun sijoitetaan ylimääräisiä datapisteitä, joiden arvo on nolla. Tämä nostaa datapisteiden määrää vaikuttamatta signaali-kohinasuhteeseen. [31, s.18.]

Taulukko 9. Hiivaekstraktia varten valitut prosessointiparametrit sekä diffuusioprosessointiparametrit.

Proc. Pars.		Diff. Proc. Pars.	
SI (F2)	2048	Maxiter	1000
SI (F1)	256	EPS	2
lb (F2)	0,1	PC	30
lb (F1)	0,1	Spisup	5
absf1	1000,1000	Scale	Logarithmic
absf2	-1000,-1000	LWF	1
absg	0	DispMin	-10,5
ph_mod (F2)	pk	DispMax	-9,11

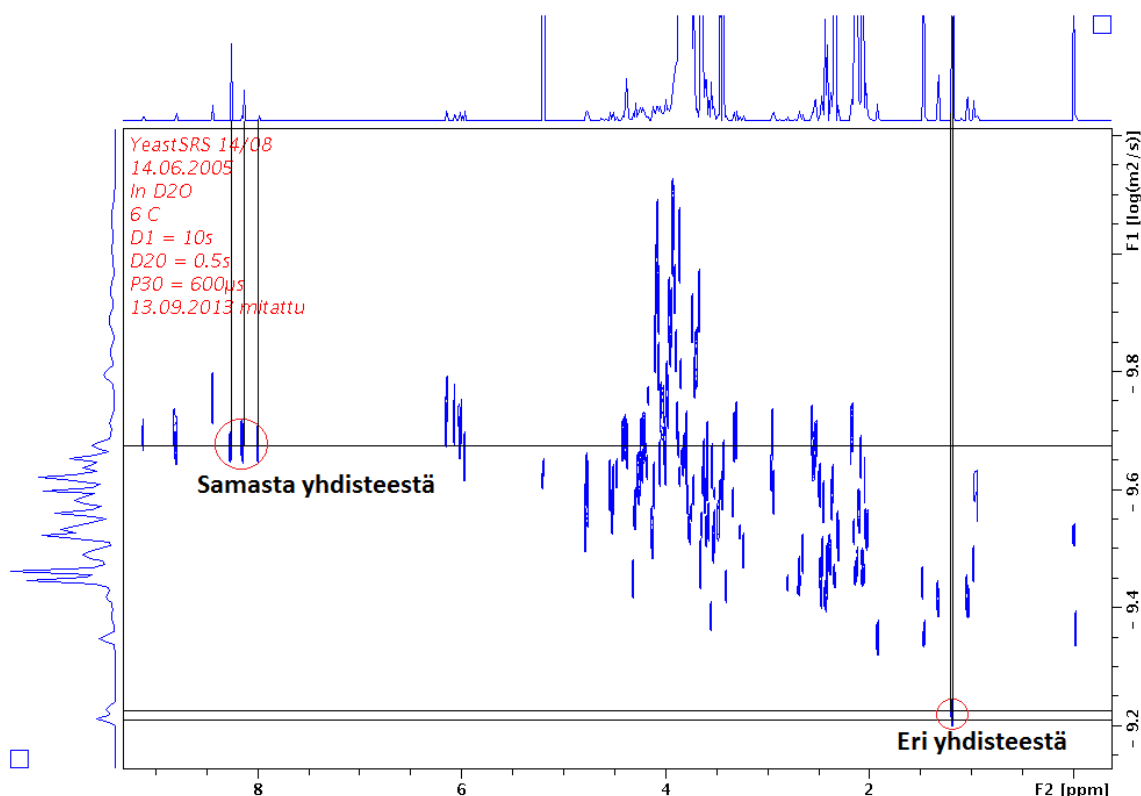
Xf2 -sekä abs2-komennon jälkeen tarkasteltiin spektriä (kuva 26). Tarkasteltaessa ylintä osaa spektristä, joka kuvaa F2-ulottuvuuden poikkileikkausta, varmistuttiin siitä, että näennäinen resoluutio ei kärsi vähennettyjen datapisteiden johdosta.



Kuva 26. Xf2- sekä abs2-komentojen jälkeinen tilanne hiivaekstraktin prosessoinnissa. Verrattaessa samaan tilanteeseen 270 kDa:n dekstraaniin (kuva 12), on kuva huomattavasti täydempi.

Alustavan prosessoinnin onnistuttua hyvin, suoritettiin lopullinen prosessointi, setdiff-parm-komentoa seurasi eddosy-komento, johon sijoitettiin taulukon 8 diffuusionprosessointiparametrien arvot. Diffuusioikkunan (dispmin ja dispmax) ollessa selvitettyinä voitiin suoraan käyttää dosy2d-komentoa prosessoinnin suorittamiseksi loppuun.

Kuvassa 27 on hiivanäytteen diffuusiospektri. Kuvaan on piirrettyä poikittaissuuntaisia viivoja jotka kuvaavat diffuusiovakioita, joista puolestaan lähtee viivoja pystysuunnassa osoittamaan mistä piikistä on kyse. Esimerkiksi noin 1,6 ppm/-9,205 log(m²/s) kohdalla oleva piikki vaikuttaisi olevan samasta yhdisteestä, mutta tarkasteltaessa piikkiä leveysuunnassa, muodostuu kyseinen piikki kahdesta yhdisteestä.



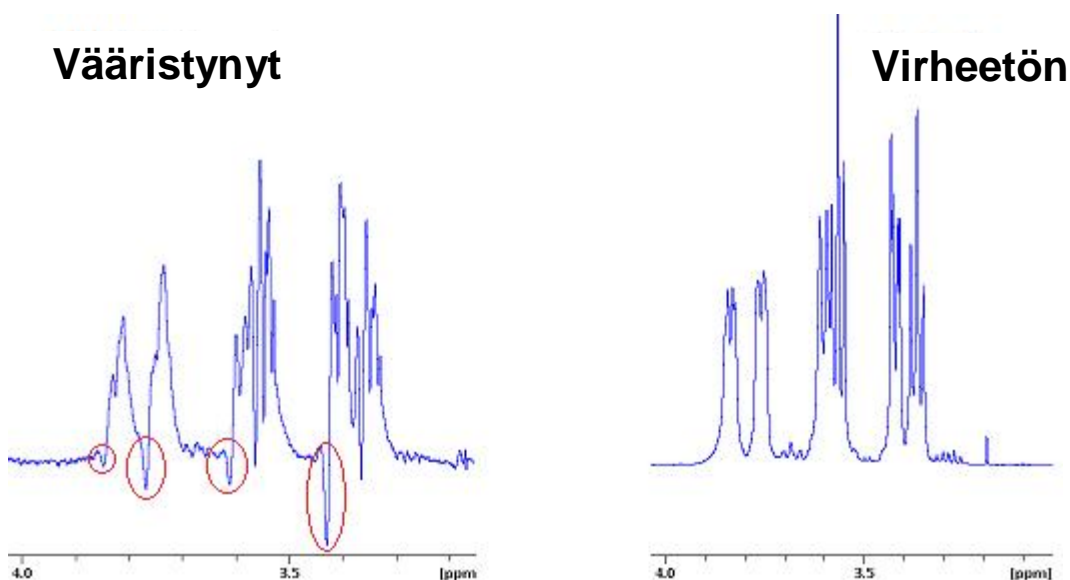
Kuva 27. Hiivaekstraktin lopullinen diffuusiospektri pulssisekvenssillä ledbpqppr2s, spektriin on lisättyä pystysuunnassa sekä poikittaissuunnassa viivoja esimerkkien havainnollistamiseksi.

5 Ongelmatilanteet

Tähän lukuun on kerätty työssä ilmenneet ongelmat, sekä niiden mahdolliset ratkaisut.

5.1 Lukon vaihevirhe

Suoritettaessa 1d-kokeita dekstraaninäytteille, havaittiin joidenkin spektrien olevan vääristyneitä. Ilmiö nähtiin aikaisemmin kuvassa 6, jossa vääristynyt spektri saatiin ledbpgp2s(1d)-pulssisekvenssillä. Vääristyminen tapahtui myös myöhemmin käytetyllä dstebpgp3s-sekvenssillä. Paremman vertailun vuoksi kuvassa 28 on sama ilmiö uudelleen, vasemmalla on vääristynyt spektri ja oikealla virheetön spektri.



Kuva 28. Kuvan vasemmalla puolella on vääristyt 1d-spektri 50 kDa:n standardista, jonka negatiiviset signaalit ovat ympyröityneenä, kuvan oikealla puolella on vertailun vuoksi puhdas spektri samasta yhdisteestä.

Vääristyneen spektrin kuvasta nähdään, kuinka piikkien juureen muodostuu negatiivinen signaali. Tämä aiheuttaa piikkien vääristymistä, joka puolestaan antaa virheellisen tuloksen diffuusiota varten. Selvitettyä syytä ilmiölle, löytyi ratkaisu NMR-keskustelupalstalta. Palstalla oli ehdotettu, että vääristyminen johtuu väärästä lukon vaiheesta, joka johtaa siihen, että lukolla on vaikeuksia palautua normaaliin tilaan gradienttipulssin jälkeen. Ongelma saatiin helposti korjattua loopadj-komennolla, jota on käytetty osiossa 4 *Työn vaiheet*. [32]

Kyseessä on komento jolla voidaan selvittää kyseisen näytteen optimaaliset lukkoon liittyvät parametrit kuten loop gain, time sekä filter. Näiden avulla saadaan stabiloitua ajallisesti pitkät kokeet, kuten diffuusiokokeet. [20]

5.2 Rajoittava teho

Kuten aiemmin kerrottiin, tuntematonta dekstraanistandardia ei saatu mitattua. Tämä johtui NMR-laitteessa käytetyssä cryoprobesta. Laitteen valmistaja Bruker on antanut suositusrajoja, joita ei tulisi ylittää. Työtä koskevat rajoitukset ovat mm. gradientin maksimivirta 10 A, gradientin maksimipituus 10 ms @ 10 A, yksittäisen gradienttipulssin (p30) maksimipituus 5000 μ s. [33, s. 4]

Gradientin maksimipituuden raja 10 ms @ 10 A tarkoittaa, että gradienttia saa ajaa täydellä teholla maksimissaan 10 ms. Dekstraanin mittaukseen käytetyssä dstebpgp3s-sekvenssissä on 8 kertaa gradienttipulssi yhden toiston aikana. Tämä tarkoittaa sitä, että maksimi p30-arvo olisi ollut 1250 μ s, sillä muuten rajoitus olisi ylitetty. Kuitenkin esimerkiksi 11 900 kDa:n standardin mittauksessa käytetty p30 on 3930 μ s, joka vastaa 31,44 ms:n gradientin käyttämistä/toisto. Vaikka tämä ylitti rajoituksen kolminkertaisesti, katsottiin, että rajoitus voitiin hetkellisesti ylittää. Rajoitus 10 ms on laskettu siten, että mittausaika/toisto olisi 1 s, kyseisessä työssä oli mittausaika/toisto liki 3 s. Gradienttia ei myöskään käytetty täydellä teholla, eli 10 A:lla, vaan maksimissaan 9,5 A, tämä antoi hieman joustoa teholle.

Tämä rajoitus kuitenkin aiheutti sen, että tuntematonta standardia ei saatu mitattua. Jotta sen olisi voinut mitata, olisi pitänyt nostaa p30-arvo 5 000 μ s:iin, joka on myös maksimiarvo, ja laskea gradientin teho liki puoleen. Tällöin diffuusio ei olisi ollut loppuun asti suoritettuna, vaan mittaus loppuisi kesken kaiken. Tämän korjaamiseksi olisi jouduttu lisäämään gradientin pituutta, jolloin ei olisi voitu taata, että mittapää ei rikkoutuisi, täten päätettiin jättää tuntematon standardi mittaamatta.

Mahdollinen ratkaisu ongelmalle olisi ollut huoneenlämpöisen mittapään käyttäminen, mutta sitä ei voitu kyseisessä tapauksessa käyttää saatavuuden takia.

5.3 Standardit 150 sekä 668

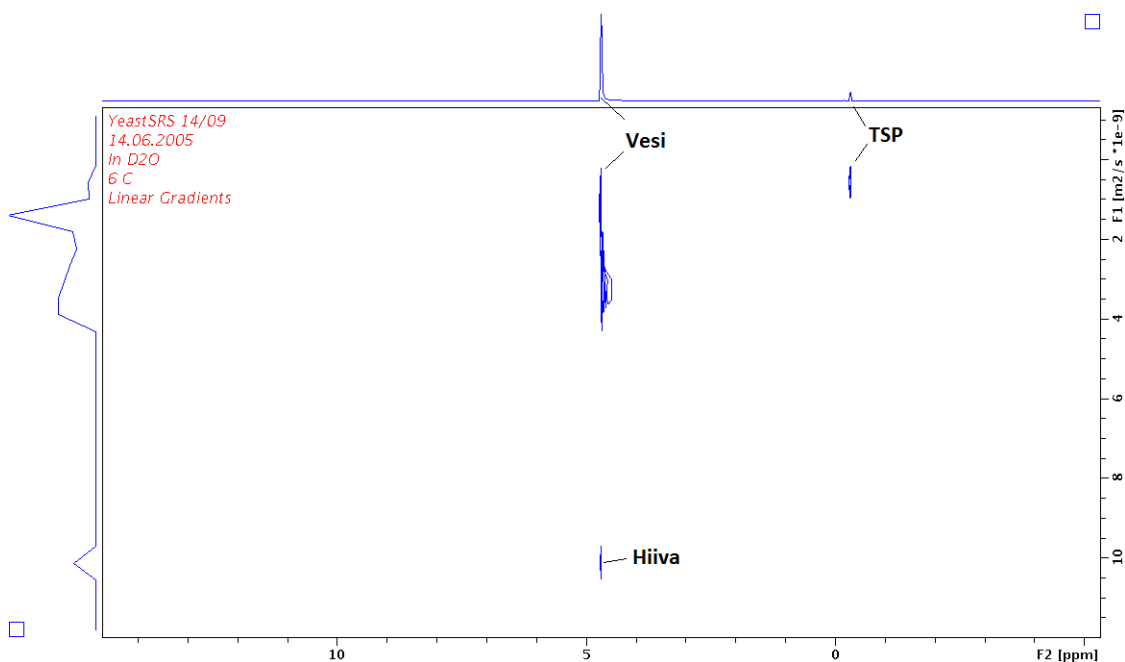
Valmistettiin mittausta varten liuos joka sisälsi 0,5 mg/ml 150 kDa:n dekstraania, sekä 0,5 mg/ml 668 kDa:n dekstraania. Mittauksen tarkoituksena oli saada yksi spektri, joka sisältää kahden eri standardin diffuusiovakiot. Tällöin voitaisiin valmistaa sekä mitata yksi dekstraaniliuos, joka sisältää erikokoisia standardeja. Jos mittaus onnistuisi, ja diffuusiovakiot olisivat samat kuin yksittäisten mittausten, voitaisiin säästää huomattavasti aikaa. Tällöin voitaisiin myös soveltaa kyseinen koe muille standardisekoituksille.

Valittiin mittausparametrit 668 kDa:n standardin mukaisesti, sillä haluttiin että kyseiselle standardille saataisiin puhdas mittaus. Tällöin mittausta ei pysäytetä, kun yhdiste on vielä diffundoitumassa, vaan annetaan signaalin vaimentua loppuun asti. Mittauksessa käytetyn suuremman tehon ansiosta, pienemmän 150 kDa:n standardin diffundoituminen olisi lopputilassa ennen kuin suuremman 668 kDa:n standardin. Tämän perusteella saataisiin standardit erottumaan toisistaan.

Tarkasteltaessa prosessoitua spektriä, huomattiin sen sisältävän vain yhden diffuusiovakion, joka sattui olemaan molempien standardien diffuusiovakioiden keskiarvo. Ongelmaa ei saatu poistettua muuttamalla mittaus- tai prosessointiparametreja.

5.4 Hiivaekstraktin pulssisekvenssi

Prosessoitaessa hiivaekstraktin spektrejä jotka oli ajettu dstebpgp3s-pulssisekvenssillä, huomattiin matriisin ja pulssisekvenssin yhteensopimattomuus. Näyte sisälsi huomattavan määrän vettä, joka häiritsi spektriä. Tämä johti siihen, että prosessoitaessa spektriä, veden signaali peitti alleen kaiken muun lukuun ottamatta muutamaa vahvaa signaalia. Kuvassa 29 on esitetty kyseinen tapaus.



Kuva 29. Hiivanäytteen diffuusiospektri käyttämällä dstebpgp3s-sekvenssiä. Spektrissä kolme signaalia, TSP, vesi, sekä hiivan yksi yhdiste.

Ongelmaa yritettiin korjata muokkaamalla dstebpgp3s-pulssisekvenssiä, sekvenssiin haluttiin lisätä presaturaatio-osio. Liitettiin dstebpgp3s-sekvenssiin ledbpgppr2s-sekvenssin **pr** (presaturation) -osio, ja suoritettiin nopea mittaus. Tarkasteltaessa mitausta, havaittiin sen olevan vääristynyt huomattavasti, todennäköisesti vaihesyklin virheestä johtuen, päätettiin käyttää ledbpgppr2s pulssisekvenssiä mittauksissa.

6 Tulokset

Dekstraanistandardien tuloksissa on verrattu sekä Varian:n, että Bruker:n laitteilla saadut diffuusiovakiot. Varian laitteella saadut tulokset ovat artikkelista, jossa on suoritettu DOSY-mittauksia samoille dekstraanistandardeille. [22]

Diffuusiovakioiden lisäksi on laskettu mitattujen standardien molekyylipainot käyttäen hyväksi valmistajan ilmoittamaa molekyylipainoa sekä saatua diffuusiovakiota.

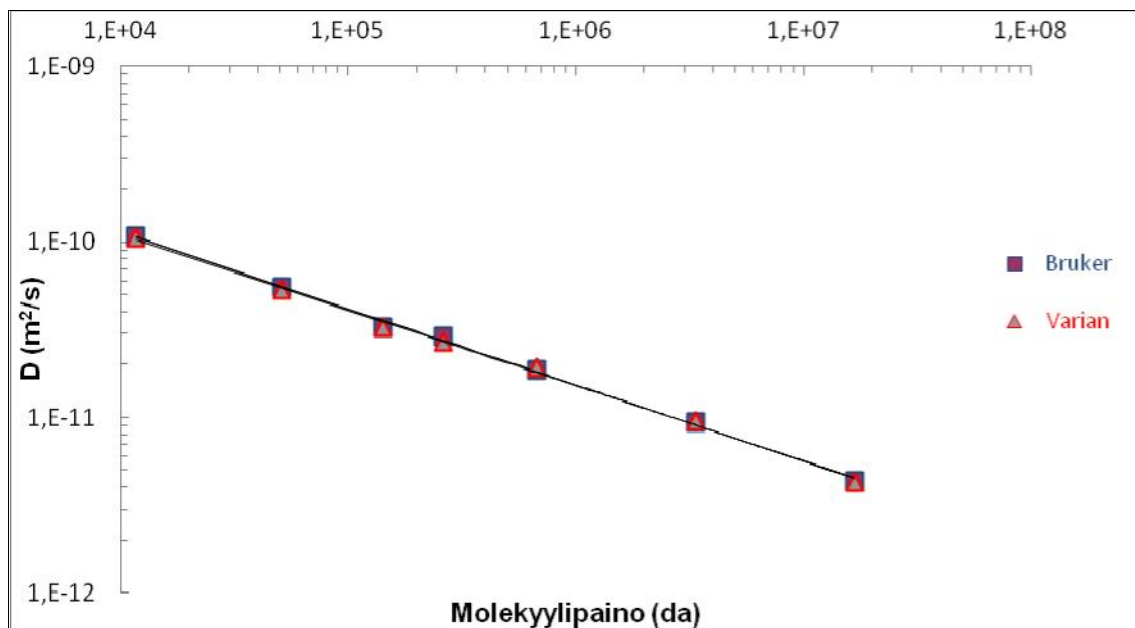
Standardien valmistajat ilmoittivat standardien koot käyttäen kahta eri menetelmää; suhteellinen kalibrointi sekä staattinen valonsirontamenetelmä (*static light scattering*). Tuloksia laskiessa käytettiin staattisella valonsirontamenetelmällä saatuja molekyylipainoja, sillä ne antoivat paremman suoran ($R^2 = 0,998$ Varian, $0,998$ Bruker) verrattuna suhteelliseen kalibrointiin ($R^2 = 0,993$ Varian, $0,9937$ Bruker).

Verrataan aluksi keskenään eri laitteilla mitattuja diffuusiovakioita. Vakiot saatiin suoraan prosessoidusta diffuusiospektristä. Taulukkoon 10 on kerätty kummallakin laitteella saadut diffuusiovakiot.

Taulukko 10. Varian laitteella [22, s.203] vs. Bruker:n laitteella saadut diffuusiovakiot

Molekyylipaino (kDa)	Diffuusiovakiot (m^2/s)	
	Varian	Bruker
12	1,05E-10	1,07E-10
50	5,37E-11	5,49E-11
150	3,26E-11	3,29E-11
270	2,69E-11	2,89E-11
668	1,99E-11	1,86E-11
3500	9,60E-12	9,44E-12
11900	4,30E-12	4,31E-12

Sovitettiin diffuusiovakiot log-log-kuvaajalle (kuva 30), jossa x-akselilla staattisen valonsirontamenetelmällä saadut molekyylipainot, ja y-akselilla mittauksista saadut diffuusiovakiot.



Kuva 30. Log-log-kuvaaja, jossa x-akselilla valmistajan ilmoittama molekyylipaino ja y-akselilla mitatut diffuusiovakiot.

Molekyylipainot voidaan laskea kalibrointisuorasta saadun suoran yhtälön avulla (kaava 6).

$$D = cM_w^b, \quad (6)$$

D = diffuusiovakio

c = kalibrointisuoran kulmakerroin

M_w = molekyylipaino

b = leikkauspiste

Laskettiin Brukerilla mitattujen standardien molekyylipainot käyttäen kyseisellä laitteella saatua suoran yhtälöä (kaava 7). Diffuusiovakion kohdalle on sijoitettu taulukosta 10 saadut arvot

$$D = 6,21 * 10^{-9} * M_w^{-0,435} \quad (7)$$

Taulukkoon 11 on kerätty yhteenveto lasketuista molekyylipainoista, joita on verrattu Varianilla saatuihin arvoihin, sekä valmistajan ilmoittamiin arvoihin.

Taulukko 11. Eri laitteilla saadut standardien molekyylipainot verrattuna toisiinsa sekä valmistajan ilmoittamiin molekyylipainoihin. [22, s. 203]

Molekyylipaino (kDa)			
Ilmoitettu		Laskettu	
Suht. Kalib.	Valosironta	Varian	Bruker
11,6	11,7	11,0	11,4
48,6	51,0	53,1	52,9
148,0	143,0	141,7	171,6
273,0	262,0	269,9	230,5
668,0	676,0	569,7	637,3
3500,0	3360,0	3048,2	3032,5
11900,0	16700,0	20172,1	18407,2

7 Johtopäätökset

Tarkasteltaessa taulukkoa 10 (Varian ja Bruker diffuusiovakiot), nähdään eri laitteilla saatujen diffuusiovakioiden olevan sopusoinnussa toistensa kanssa. Huomioitavana on se, että DOSY-mittauksissa on prosessointivaiheessa tehdyillä valinnoilla suuri merkitys diffuusiovakiolle. Tehdyssä työssä on huomioitu tämä vaikutus, ja on pyritty siihen, että jokainen standardi olisi prosessoitu samalla tavalla. Siksi muutettiin ainoastaan scalingparametria logaritmisesta lineaariseksi, jättäen muut arvot oletuksiksi.

Diffuusiovakioista voidaan jo suoraan sanoa, että menetelmän pystyttäminen on ollut onnistunutta, sillä eri laitteella on voitu luoda menetelmä, jonka tulokset ovat yhtäpitäviä Varianilla saatujen tulosten kanssa. Kuvan 30 suorien R^2 ollessa 0,998, pääteltiin niiden tukevan aiempaa päätelmää.

Verattaessa Brukerilla saatuja tuloksia Varianin tuloksiin (taulukko 11), ovat suurimmat eroavaisuudet 150, 270, 668 sekä 11900 kDa:n standardeissa. Kuten Varianin mittauksissa ehdotettiin, on mahdollista, että liuoksissa tapahtuu aggregoitumista. Tämä johtaa molekyyliarakenteessa muutoksiin, jotka häiritsevät diffundoitumista, mikä vaikuttaa suoraan diffuusiovakioon. [22, s. 205.] Tarkemman tiedon puuttuessa, on epävarmaa onko Varianin sekä Brukerin mittauksissa jotain oleellista eroa, kuten eroavaisuuksia parametreissa, laitteissa tai itse menettelyssä.

Vaikka standardisekoituksen mittauksia ei pystytty suorittamaan, uskotaan sen kuitenkin olevan mahdollista. Kyseessä on mahdollisesti vain prosessiparametrien viilaus, sillä uskotaan että mittausparametrit ovat kohdillaan.

Hiivaekstraktimittauksen tavoitteeksi oli asetettu monipuolisen näytteen diffuusioerottelelu, jota pystyttäisiin käyttämään pohjana tulevia mittauksia varten. Hiivaekstraktin diffuusiokokeen katsottiin onnistuneen. Yhdisteet pystyttiin erottamaan toisistaan, vaikka ei pystytty tunnistamaan yhdisteitä, taikka niiden diffuusiovakioita.

VTT:n aikaisempien analyysien mukaan ekstraktista löytyisi mahdollisesti taulukossa 12 esiintyviä yhdisteitä.

Taulukko 12. Mahdollisia hiivaekstraktissa esiintyviä yhdisteitä

Glukoosi	Oksaloasettaatti	Metyyylimalonaatti	Laktaatti
Glukoosi-6-fosfaatti	Sitraatti	Malonaatti	Etanoli
Fruktoosi-6-fosfaatti	Isositraatti	Glutacioni	Metanoli
Fruktoosi-1,6-bisfostaatti	Sukkinaatti	NADH	Asetaatti
3-P-glyseraatti	Fumaraatti	NADP	Trehaloosi
2-P-glyseraatti	Malaatti	NADPH	Glyseroli
Fosfoenolipalorypähappo	Palorypähappo	ATP	UDP-glukoosi

8 Pohdintaa

Työn molempien vaiheiden, dekstraanistandardien mittausten, sekä hiivaekstraktin mittaust, katsottiin onnistuneen. Tehdyn työn pohjalta voidaan jatkaa seuraavasti: suorittaa mittauksia muille standardeille, jatkaa hiivaekstraktin yhdisteiden tunnistamista taulukon 11 pohjalta, tutkia dekstraanistandardien aggregoitumista sekä ylipäänsä toistaa mittaukset samoilla standardeilla, jolloin voidaan nähdä menetelmän toistettavuus.

Olisi mielenkiintoista selvittää menetelmä, jolla voitaisiin mitata standardisekoituksia, kuten 150 ja 668 kDa:n dekstraanisekoitus. Tämä helpottaisi esimerkiksi menetelmän toistossa, jouduttaisiin optimoimaan mittauserimetrit vain suurimmalle standardille.

Mikäli käytettävissä olisi ollut joko huoneenlämpöinen mittapää (voitaisiin kiertää tehon rajoitus), diffuusio mittapää (huomattavasti voimakkaammat gradientit) tai pienempi tuntematon dekstraanistandardi, olisi ollut mielenkiintoista käyttää kalibrointisuoraa tuntemattoman molekyylipainon selvittämiseksi. Tulosta olisi voitu verrata valmistajan ilmoittamaan arvoon, saaden selville menetelmän tarkkuutta.

Lähteet

- 1 Hornak J. 1998. The Basics of NMR. Verkkodokumentti.
<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>. Luettu 21.10.2013.
- 2 Scientific Instrument Services. Verkkodokumentti.
<http://www.sisweb.com/referenc/source/exactmas.htm>. Luettu 3.11.2013
- 3 McCormick J. 2009. Measurement of Group Electronegativity using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Verkkodokumentti.
http://chemlab.truman.edu/chemlab_backup/CHEM131Labs/Electronegativity.htm. Luettu 22.10.2013.
- 4 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Theoretical principles. Verkkodokumentti.
<http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/nmr1.htm>. Luettu 3.11.2013.
- 5 The NIST reference on Constants, Units, and Uncertainty. Verkkodokumentti. <http://physics.nist.gov/cgi-bin/cuu/Value?gammap>. Luettu 2.11.2013.
- 6 Nerz-Stormes M. The Basics Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Verkkodokumentti.
http://www.brynmawr.edu/chemistry/Chem/mnerzsto/The_Basics_Nuclear_Magnetic_Resonance%20_Spectroscopy_2.htm. Luettu 3.11.2013.
- 7 Derome, A. E. 1987. Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Oxford: Pergamon press.
- 8 Vector model. Verkkodokumentti.
http://www.chemie.uni-hamburg.de/nmr/insensitive/tutorial/en.lproj/vector_model.html. Luettu 3.11.2013.
- 9 The Vector Model of NMR. Verkkodokumentti.
http://chem4823.usask.ca/nmr/vector_model.html. Luettu 2.11.2013.
- 10 Harvard Medical School. 2006. Verkkodokumentti
<http://www.spl.harvard.edu/archive/HypX/theory2.html>. Luettu 2.11.2013.
- 11 Manchester NMR Methodology Group. Verkkodokumentti.
<http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/25>. Luettu 3.11.2013.
- 12 Ovenden S & Bourne D. The Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) Pulse Sequence and Defence Applications. 2008. Verkkodokumentti.
www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA485737. Luettu 2.11.2013.

- 13 Hoffman R. Diffusion NMR. Verkkodokumentti.
<http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/other/diff/diff.html>. Luettu 3.11.2013.
- 14 Bruker. DOSY and Diffusion by NMR. Verkkodokumentti.
ftp://nmr2.chem.uu.nl/pub/topspin_pdfs/DOSY_and_Diffusion.pdf. Luettu 3.11.2013.
- 15 Orgaanisen kemian laboratorio-opas. 2005. Verkkodokumentti.
<http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemialabraopas/metodit/reakseuran/NMR/NMR.htm>. Luettu 1.11.2013.
- 16 Keeler J. 2002. How the spectrometer works. Verkkodokumentti.
<http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/Irvine/chapter5.pdf>. Luettu 1.11.2013
- 17 Bruker. 2013. Verkkodokumentti.
<http://www.bruker.com/products/mr/nmr/probes/cryoprobes/qci-p-cryoprobe/overview.html>. Luettu 1.11.2013.
- 18 Bruker. 2013. Verkkodokumentti.
<http://www.bruker.com/products/mr/nmr/avance-iii-hd/technical-details.html>. Luettu 1.11.2013.
- 19 University of Ottawa NMR Facility Blog. 2007. Verkkodokumentti. <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.fi/2007/11/testing-magnet-for-field-drift.html>. Luettu 1.11.2013.
- 20 Mark Wainwright Analytical Centre Nuclear Magnetic Resonance Facility. 2011. Verkkodokumentti.
<http://www.nmr.unsw.edu.au/usercorner/introduction/locking.htm>. Luettu 1.11.2013.
- 21 Dekstraani kuva. <http://image.made-in-china.com/2f0j00ahTtkBQKoaHE/Dextran-70.jpg>. Luettu 1.11.2013.
- 22 Maina N., Pitkänen L., Heikkinen S., Tuomainen P., Virkki L. & Tenkanen M., Challenges in analysis of high-molar mass dextrans: Comparison of HPSEC, AsFIFFF and DOSY NMR spectroscopy. 2013. Verkkodokumentti.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713008023>. Luettu 3.10.2013.
- 23 de Belder A. Dextran. Verkkodokumentti.
<http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don%27t%20move/18116612AA.pdf>. Luettu 27.09.2013.

- 24 The Pulse Programs "zg" and "zg30". 2003. Verkkodokumentti.
<http://triton.iqfr.csic.es/guide/man/beginners/chap8-1.htm>. Luettu 20.09.2013.
- 25 Hornak J. 1998. The Basics of MRI. Verkkodokumentti.
<http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/chap-12/chap-12.htm>. Luettu 27.09.2013.
- 26 Correction Gradients. 2005. Verkkodokumentti.
http://www.81bones.net/mri/mri_correctionGradients.pdf. Luettu 27.09.2013.
- 27 Dosy/Diffusion on Avance III Spectrometers. 2013. Verkkodokumentti.
http://www.chem.wisc.edu/~cic/nmr/Guides/Ba3vug/AV3_DOSY-diffusion.pdf. Luettu 11.08.2013.
- 28 Bruker. Basic 1D and 2D Experiments. 2005. Verkkodokumentti.
http://www.as.miami.edu/chemistry/pdf/NMRmanuals/basic_1d_and_2d_experiments.pdf. Luettu 19.09.2013.
- 29 T1-relaksaatio. Verkkodokumentti.
<http://www.chem.queensu.ca/facilities/NMR/nmr/topspin/images/t1-small.gif>. Luettu 19.09.2013.
- 30 Queens University. 2003. Measuring relaxation time T1. Verkkodokumentti.
<http://www.chem.queensu.ca/facilities/NMR/nmr/topspin/relaxation-t1.html>. Luettu 11.08.2013.
- 31 Basic Practical NMR concepts: A guide for the Modern Laboratory. 2012. Verkkodokumentti.
<http://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/handouts/DH%20NMR%20Basics.pdf>. Luettu 17.10.2013.
- 32 NMRwiki Q&A. Keskustelupalsta.
<http://qa.nmrwiki.org/question/216/distorted-dosy-id>. Luettu 17.09.2013.
- 33 Bruker. Typical Pulses for the 5 mm CryoProbe 500 MHz and 600 MHz. Verkkodokumentti.
http://www.nmr.ibms.sinica.edu.tw/Doc/CryoProbe_Bruker_Pulse.pdf. Luettu 17.09.2013.